

## I K K - i キナーゼの新たな基質 I - T R A F の同定

技術分野

本発明は、新規な I  $\kappa$  B キナーゼ、その遺伝子及び医薬組成物に関する。より詳細には、本発明は免疫応答に関わる種々の遺伝子の発現を制御する転写因子 N F -  $\kappa$  B を活性化することができ、かつ I - T R A F に結合しリン酸化する新規のセリン/スレオニンキナーゼである新規 I  $\kappa$  B キナーゼ I K K - i に関する。

背景技術

マクロファージは生体防御において重要な役割を果たしており細菌感染や悪性腫瘍の浸潤に対し、貪食、抗原提示、などの機能を果たすことが知られている。またマクロファージはリポポリサッカライド (L P S) や炎症性サイトカインによって活性化され、主要組織適合抗原、T N F -  $\alpha$  (tumor necrosis factor -  $\alpha$ )、I L - 1  $\beta$  (interleukin - 1  $\beta$ )、I L - 6 (interleukin - 6)、M I P - 1  $\alpha/\beta$  (macrophage inflammatory protein - 1  $\alpha/\beta$ ) などの免疫応答に関わる種々の遺伝子を発現することが知られている。

N F -  $\kappa$  B は免疫応答に関わる種々の遺伝子の発現を制御する転写因子である。L P S、T N F -  $\alpha$ 、I L - 1  $\beta$  などによって活性化され、T N F -  $\alpha$ 、I L - 1  $\beta$ 、I  $\kappa$  B -  $\alpha$  など免疫応答に重要な遺伝子の転写が N F -  $\kappa$  B の支配を受けていることが知られている。

本発明者らは、免疫応答に関わる新規遺伝子を同定するため、マクロファージ系腫瘍株である R A W 2 6 4 . 7 の L P S 刺激 (+) 群と (-) 群との間でサブトラクションを施行した。得られた遺伝子のうちクローン # 2 F 9 は、最近同定され N F -  $\kappa$  B を活性化することが知られている I  $\kappa$  B キナーゼ -  $\alpha$ ,  $\beta$  (I  $\kappa$  B kinase -  $\alpha$ ,  $\beta$ ) (DiDonato JA, et al., Nature 1997 Aug 7;388(6642):548-554 ; Zandi E, et al., Cell 1997 Oct 17;91(2):243-252 ; Mercurio

F, et al., Science 1997 Oct 31;278(5339):860-866 ; Woronicz JD, et al., Science 1997 Oct 31;278(5339):866-869 ; Regnier CH, et al., Cell 1997 Jul 25;90(2):373-383) とホモロジーを持つ新規遺伝子であることが明らかになり、本発明者らはこの新規遺伝子がコードする蛋白質を I K K - i ( i n d u c i b l e - I  $\kappa$  B k i n a s e ) と命名した。

#### 発明の開示

本発明は、免疫応答に関わる種々の遺伝子の発現を制御する転写因子 N F -  $\kappa$  B を活性化することができる新規のセリン／スレオニンキナーゼである新規 I  $\kappa$  B キナーゼ I K K - i、それをコードする遺伝子及びそれを含有してなる医薬組成物を提供する。

本発明者らは、I K K - i は I  $\kappa$  B -  $\alpha$  をリン酸化し N F -  $\kappa$  B を活性化する新規セリン／スレオニンキナーゼであることを証明し、その発現が種々の炎症性サイトカインにより誘導されることを明らかにした。

本発明は、配列番号 2 若しくは 4 で表されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列中の 1 個以上のアミノ酸が欠失し、他のアミノ酸で置換され、及び／又は、1 個以上の他のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有し、転写因子 N F -  $\kappa$  B を活性化することができる蛋白質に関する。本発明の蛋白質は新規なセリン／スレオニンキナーゼである。

また、本発明は、前記の新規な蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子に関する。より詳細には、本発明は、配列番号 1 又は 3 で表される塩基配列を有する遺伝子に関する。

さらに、本発明は、前記した蛋白質、及び、製薬上許容される担体からなる医薬組成物に関する。本発明の医薬組成物は、転写因子 N F -  $\kappa$  B を活性化することができ免疫応答機構に作用する。また本発明の医薬組成物は、I - T R A F 又は T R A F 分子が関与する疾患の予防、治療剤として有用である。

#### 図面の簡単な説明

第 1 図は、L P S による刺激前 ( - ) と刺激後 ( + ) の I K K - i の m R N A

発現の誘導のノザンブロット解析の結果を示す図面に代わる写真である。図の下段はG 3 P D Hを用いた場合を示す。

第2図は、I K K - i のL P S刺激後のm R N A発現を時間の経過によりノザンブロット解析を行った結果を示す図面に代わる写真である。図の下段はG 3 P D Hを用いた場合を示す。

第3図は、ヒトI K K - i とマウスI K K - i のアミノ酸配列の比較を示す。図中の長方形で囲まれた部分は同一の配列を示し、[ ] の部分はキナーゼドメインを示し、\*印はロイシンジッパードメインを示す。

第4図は、I K K - i とI K K -  $\alpha$ 、I K K -  $\beta$  のアミノ酸配列の比較を示す。図中のバックをグレーに配色した部分は同一の配列を示し、[ ] の部分はキナーゼドメインを示し、長方形で囲んだ部分はアクチベーションループを示し、\*印はキナーゼ活性に重要であると考えられるアミノ酸残基を示す。

第5図は、ノザンブロット解析による各臓器におけるI K K - i の発現を示した図面に代わる写真である。

第6図は、ノザンブロット解析によるB - 細胞とT - 細胞におけるI K K - i の発現を示した図面に代わる写真である。図の下段はG 3 P D Hを用いた場合を示す。

第7図は、ノザンブロット解析によるマウスの腫瘍株におけるI K K - i の発現を示した図面に代わる写真である。図の下段はエチジウムブロマイドで染色したトータルR N Aを示す。

第8図は、マウス腹腔マクロファージにおけるノザンブロット解析による種々の刺激によるI K K - i の誘導を示した図面に代わる写真である。図の下段はG 3 P D Hを用いた場合を示す。

第9図は、I K K - i の強制発現によるN F -  $\kappa$  B レポーター遺伝子の活性化の結果を示したものである。図の下段は、タンパク量を抗F L A G 抗体 (M 2) によるイミュノブロットにより評価した結果を示す図面に代わる写真である。

第10図は、インビトロでのI K K - i によるI  $\kappa$  B -  $\alpha$  のリン酸化の結果を示した図面に代わる写真である。図の下段は、タンパク量を抗F L A G 抗体 (M 2) によるイミュノブロットにより評価した結果である。

第11図は、IKK-iとI-TRAFの細胞内における複合体の形成を示す図面に代わる写真である。第11図のレーン1はFlag-IKK-iを、レーン2はMyc-I-TRAFを、レーン3はFlag-IKK-iとMyc-I-TRAFを示す。

第12図は、I-TRAFの欠失変異体を用いたKK-iとの結合領域の検索を示す図面に代わる写真である。第12図のレーン1は1-170断片を、レーン2は1-247断片を、レーン3は193-stop断片を、レーン4は全長(FL(Full length))をそれぞれ示す。

第13図は、IKK-iによるI-TRAFのリン酸化を示す図面に代わる写真である。第13図のレーン1、3及び5はFlag-IKK-iのみをトランスフェクションしたものを、レーン2、4及び6は両者をトランスフェクションしたものを示す。

第14図は、I-TRAFのリン酸化部位の検索の結果を示す図面に代わる写真である。第14図のレーン1及び5は1-170断片を、レーン2及び6は1-247断片を、レーン3及び7は193-stop断片を、レーン4及び8は全長(FL(Full length))をそれぞれ示す。

第15図は、精製GST-I-TRAFのIKK-iによるリン酸化を示す図面に代わる写真である。第15図のレーン1はFlag-IKK-iをトランスフェクションしたものを示し、レーン2は変異体IKK-i(K38A)をトランスフェクションしたものを示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

まず、本発明のIKK-iのcDNAクローニングについて説明する。

サブプレシジョンサブトラクティブハイブリダイゼーション法(suppression subtractive hybridization technique)を用いて、マクロファージ系腫瘍株であるRAW264.7のリボポリサッカライド(LPS)刺激における(+)群と(-)群との間でサブトラクションを施行し、LPS刺激により誘導されてくる遺伝子のスクリーニングを行った。MIP-1 $\alpha/\beta$ 、G-CSF、TNF- $\alpha$ などの既知遺伝子に加え、7つの新規遺伝子のフラグメントを得た。

このうちクローン#2F9は、刺激を加えないRAW264.7ではわずかに発現を認めるのみだが4時間のLPS刺激後、劇的に発現量が増加した(第1図参照)。第1図は、マクロファージ系腫瘍株RAW264.7をリボポリサッカライド(LPS)で刺激して誘導されてくる遺伝子のノザンプロット解析を示したものである。RAW264.7のLPS(100 ng/ml)刺激前(-)後(+)のポリ(A)<sup>+</sup>RNA 2 μgを1%フォルムアミド-アガロースにて電気泳動し、ナイロンメンブレンに転写後、サブトラクションで得られたIKK- $\alpha$ のcDNAフラグメント(2F9)をプローブに用いてハイブリダイズさせた。RNA量が等量であることをG3PDHを用いて第1図の下段に示した。

また、このmRNAの発現の時間経過を調べると、LPS刺激後2時間から増加し始め、4時間でピークに達し24時間でもとのレベルに戻った(第2図参照)。

第2図は、RAW264.7を100 ng/mlのLPSで刺激し、各レーン上に示した時間の後にトータルRNAを抽出し25 μgずつ1%フォルムアミド-アガロースにて電気泳動し、第1図の場合と同様にノザンプロット解析を行った結果を示したものである。プローブはマウスIKK- $\alpha$  (mIKK- $\alpha$ )のコーディング領域を用いた。RNA量が等量であることをG3PDHを用いて第2図の下段に示した。

RAW264.7を4時間LPS刺激して得たmRNAからcDNAライブラリーを作製し、2F9のフラグメントをプローブとしてこの遺伝子の全長を得た。この遺伝子は2154 bpのオープンリーディングフレーム(open reading frame)に718アミノ酸をコードしていた。ホモロジー検索の結果、データベース上では塩基配列のみが決定され、機能が未知のヒトcDNAクローンKIAA0151と最もホモロジーが高く、相同性はアミノ酸レベルで82.3%であり2F9はKIAA0151のマウスのカウンターパートであると考えられた。

KIAA0151に次いで相同性の高かった遺伝子は、最近同定されIKB- $\alpha$ をリン酸化しNF- $\kappa$ Bを活性化することが明らかになったIKBキナーゼ $\alpha$ ,  $\beta$  (IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$ )であり、キナーゼドメインの相同性はアミノ酸レベルでそれぞれ29.1%、30.1%であった。

2 F 9、K I A A 0 1 5 1 にはともに N-末端にセリン／スレオニンキナーゼドメイン、中央にロイシンジッパードメインが 2 つ認められ、I K K- $\alpha$ 、I K K- $\beta$  との構造の類似性と後に述べるこの分子の機能から、本発明者らはこの新規キナーゼを *i n d u c i b l e - I K K ( I K K - i )* と命名した。

ヒト I K K-*i* とマウス I K K-*i* のアミノ酸配列の比較を第 3 図に、ヒト I K K-*i*、ヒト I K K- $\alpha$ 、ヒト I K K- $\beta$  のアミノ酸配列の比較を第 4 図に示した。

第 3 図では、同一の配列を長方形で囲んでおり、キナーゼドメインを [ ] で示した。また、ロイシンジッパードメインの下に \* 印を記している。

第 4 図では、同一の配列のバックをグレーに配色し、キナーゼドメインを [ ] で示している。アクチベーションループを長方形で囲んでおり、アクチベーションループの配列でキナーゼ活性に重要であると考えられるアミノ酸残基の上に \* 印を記している。I K K- $\alpha$ 、I K K- $\beta$  のヘリックスループ-ヘリックス構造の下にアンダーラインを引いている。

次に本発明者らは、各臓器における I K K-*i* の発現をノザンブロットで解析した。I K K- $\alpha$ 、I K K- $\beta$  がどの組織にも普遍的に発現しているのに対し I K K-*i* の m R N A は脾臓、胸腺、末梢血白血球、脾臓、胎盤に特異的に多く発現していた (第 5 図参照)。第 5 図の各レーン上に記された臓器から得られたポリ (A)<sup>+</sup> R N A 2  $\mu$  g がプロットされたマルチティッシュノザンブロットメンブレン (C l o n t e c h) を用いてノザンブロット解析を行った。プローブはヒト I K K-*i* (h I K K-*i*) のコーディング領域を用いた。

脾臓で認められる I K K-*i* の発現がどの細胞集団に由来するものなのかを調べるために、抗 B 2 2 0 抗体を使って B-細胞と T-細胞を分離し、B-細胞は L P S の刺激前 (-) 後 (+) で、T-細胞はフォルボールエステルとカルシウムイオノフォアの刺激前 (-) 後 (+) でそれぞれ I K K-*i* の発現をノザン解析した。B-細胞では L P S 刺激しなければ検出できないが、L P S 刺激により発現が誘導された。T-細胞では構成的に発現しているがフォルボールエステルとカルシウムイオノフォアの刺激により発現が低下した (第 6 図参照)。

第 6 図は、C 5 7 B L / 6 から採取した脾細胞から抗体 (B 2 2 0) を用いて、

高勾配磁気細胞分離装置 (high-gradient magnetic cell separation system) MACS (Miltenyi Biotec, Berg.-Gladbach, Germany) によってB-細胞とT-細胞を分離し、B-細胞はLPS:  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、T-細胞はイオノマイシン:  $10 \mu\text{M}$ とPMA:  $10 \text{ ng}/\text{ml}$ で4時間刺激し、各刺激の前後でトータルRNAを抽出し $20 \mu\text{g}$ ずつ、1%フォルムアミド-アガロースにて電気泳動し第2図の場合と同様にノザンプロット解析を行った。プローブはマウスIKK-i (mIKK-i) のコーディング領域を用いた。RNA量が等量であることをG3PDHを用いて第6図の下段に示した。

次に、いくつかのマウスの細胞株におけるIKK-iの発現をLPS刺激前(-)後(+)で解析した。5E3 (natural killer cell clone) とM1 (Monocytic leukemia cell line) においてLPS刺激によってIKK-iの発現が誘導された(第7図参照)。

第7図の各レーン上に記された腫瘍株NIH3T3 (fibroblast cell line)、EL-4 (thymoma cells)、5E3 (natural killer cell clone)、MOPC 315 (myeloma cells)、BCL-1 (B cell leukemia)、M1 (monocytic leukemia cell line) から、4時間のLPS ( $100 \text{ ng}/\text{ml}$ ) 刺激前(-)後(+)でトータルRNAを抽出し第2図の場合と同様にノザンプロット解析を行った結果である。プローブはmIKK-iのコーディング領域を用いた。RNA量が等量であることを、エチジウムブロマイドで染色したトータルRNAの電気泳動像を用いて第7図の下段に示した。

さらに、LPS以外の刺激によってもIKK-iの発現が増強するのか否かを検討した。C57BL/6から採取した腹腔マクロファージをLPS、PMA、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6によって4時間刺激した後にIKK-iの発現を見た。IKK-iはLPS以外にもTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6によっても発現が誘導されたがPMAによっては誘導されなかった(第8図参照)。

第8図は、C57BL/6から採取した腹腔マクロファージを、第8図の各レーン上に示した様にLPS:  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、PMA:  $10 \text{ ng}/\text{ml}$ 、TNF- $\alpha$ :  $100 \text{ ng}/\text{ml}$ 、IL-1 $\beta$ :  $100 \text{ ng}/\text{ml}$ 、IFN- $\gamma$ :  $250 \text{ U}$

／ml、IL-6：2000U／mlで刺激後トータルRNAを抽出し第2図の場合と同様にノザンプロット解析を行った結果を示したものである。プローブはmIKK-iのコーディング領域を用いた。RNA量が等量であることをG3PDHを用いて第8図の下段に示した。

IKK- $\alpha$ 、IKK- $\beta$ は細胞内に強制発現させるとNF- $\kappa$ Bを活性化することがレポータージーンアッセイにより証明されている。IKK-iにおいてもその構造の類似性からNF- $\kappa$ Bを活性化する可能性があると考えことから、レポータージーンアッセイによりIKK-iのNF- $\kappa$ B活性化能を検討した。

まず、IKK-iのN-末端にFLAGエピトープをタグしpEF-BOS発現ベクターに組み込んだ構築を作製した(pEF-BOS-FLAG-WT-IKK-i)。pEF-BOS-FLAG-IKK-iまたはベクターのみのコントロールをNF- $\kappa$ Bのルシフェラーゼレポーターコンストラクトと293T細胞に一過性的にコトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定した。この結果、IKK-iはその発現量依存性にNF- $\kappa$ Bを活性化することが明らかになった(第9図参照)。

第9図は、293T細胞に、NF- $\kappa$ Bコンセンサスシーケンスにルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポーターコンストラクト(pNF- $\kappa$ B-Luc)と、IKK-i遺伝子のN-末端にFLAGエピトープをタグしpEF-BOS発現ベクターにサブクローンしたコンストラクト(pEF-BOS-FLAG-WT-IKK-i)またはベクターのみのコントロールを一過性的にコトランスフェクションしルシフェラーゼ活性を測定した結果を示したものである。総DNA量はpEF-BOS-ベクターによって4 $\mu$ gに統一した。トランスフェクトしたpEF-BOS-FLAG-WT-IKK-iの量をグラフの下に示し、第9図の下段にタンパク量を抗FLAG抗体(M2)によるイミュノプロットにより評価したものを示す。

IKK- $\alpha$ 、IKK- $\beta$ はインビトロでIKB- $\alpha$ をリン酸化することが知られている。そこで、本発明のIKK-iが、IKB- $\alpha$ のN-末端に存在する32番目と36番目のセリン残基をリン酸化するの可否かをインビトロキナーゼアッセイ(in vitro kinase assay)により解析した。



pEF-BOS-FLAG-WT-IKK-i又はIKK-iの38番目のリジンをアラニンに変化させたミュータントコンストラクト (pEF-BOS-FLAG-K38A-IKK-i) を298T細胞に一過性にトランスフェクションした。24時間後に発現されたIKK-iタンパクまたはK38A-IKK-iタンパクを抗FLAG抗体 (M2) によって免疫沈降により精製し、インビトロキナーゼアッセイに用いた。

基質として、I $\kappa$ B- $\alpha$ のアンキリンリピートよりC-末端をとりのぞいたGST-I $\kappa$ B- $\alpha$ Nタンパク (WT)、またはGST-I $\kappa$ B- $\alpha$ Nの32番目と36番目のセリン残基をどちらもアラニンに変えたGST-I $\kappa$ B- $\alpha$ Nタンパク (AA) を用いた。約80kDaにIKK-iの自己リン酸化のバンドがBOS-FLAG-WT-IKK-iのレーンに認められた。IKK-iはGST-I $\kappa$ B- $\alpha$ Nタンパク (WT) をリン酸化したが、K38A-IKK-iはGST-I $\kappa$ B- $\alpha$ Nタンパク (WT) をリン酸化しなかった。また、IKK-iはGST-I $\kappa$ B- $\alpha$ Nタンパク (AA) を全くリン酸化しなかった (第10図参照)。

第10図は、インビトロ (in vitro) でのIKK-iによるI $\kappa$ B- $\alpha$ のリン酸化の結果を示したものである。293T細胞にpEF-BOS-MOCKまたはpEF-BOS-FLAG-WT-IKK-iまたは38番目のリジンをアラニンに変化させたミュータントコンストラクト (pEF-BOS-FLAG-K38A-IKK-i) を一過性的にトランスフェクションした。24時間後に発現されたIKK-iタンパクまたはK38A-IKK-iタンパクを抗FLAG抗体 (M2) によって免疫沈降により精製し、インビトロキナーゼアッセイに用いた。基質としてI $\kappa$ B- $\alpha$ のアンキリンリピートよりC-末端をとりのぞいたGST-I $\kappa$ B- $\alpha$ Nタンパク (WT)、またはGST-I $\kappa$ B- $\alpha$ Nの32番目と36番目のセリン残基をどちらもアラニンに変えたタンパク (AA) を大腸菌に発現させグルタチオンセファロースで精製したものをを用いた。IKK-iまたはK38A-IKK-iと基質と[ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATPを30℃、20分間反応させた後SDS-PAGEに展開後オートラジオグラフィにて評価した。矢印で自己リン酸化のバンドとGST-I $\kappa$ B- $\alpha$ Nのバンドを示した。分子量 (単位

kDa) を左に示した。第10図の下段にタンパク量を抗FLAG抗体(M2)によるイミュノブロットにより評価した結果を示した。

以上の結果から、本発明のIKK-iは、NF- $\kappa$ Bの活性化に重要なIKBのN-末端に存在するセリン残基をリン酸化することが明らかになった。

本発明のIKK-iのcDNAクローニングの結果明らかにされた塩基配列及びそのアミノ酸配列を配列表に示す。配列番号1はヒトIKK-i(hIKK-i)の塩基配列を示しており、配列番号2はhIKK-iのアミノ酸配列を示している。また、配列番号3はマウスIKK-i(mIKK-i)の塩基配列を示しており、配列番号4はmIKK-iのアミノ酸配列を示している。

本発明のIKK-iは、N-末端にキナーゼドメインを、中央にロイシンジッパードメインを有する新規のセリン/スレオニンキナーゼであり、そのmRNAの発現はマクロファージにおいてLPS刺激によって誘導されることが明らかになった。本発明のIKK-iのアミノ酸配列は、IKBをリン酸化し、NF- $\kappa$ Bを活性化するIKK- $\alpha$ 、IKK- $\beta$ と高い相同性を示した。

本発明のIKK-iは、脾臓、胸腺、末梢血白血球などに構成的に発現しており、脾臓ではT-細胞に構成的に発現していた。またB-細胞、腹腔マクロファージ、ナチュラルキラー(natural killer)細胞、モノサイト系腫瘍株をLPS刺激すると発現が増強し、腹腔マクロファージをTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6で刺激することによっても発現が増強した。これらのノザンブロット解析の結果から、IKK-iの発現が、主に免疫担当細胞や炎症反応に関わる細胞に偏っており、炎症性の刺激により増強したことからIKK-iは炎症反応に関わる分子であると考えられる。

IKK-iのNF- $\kappa$ B活性能をレポータージーンアッセイによって解析したところ、293T細胞にIKK-iを強制発現すると蛋白量依存性にNF- $\kappa$ Bが活性化されることが明らかになった。IKK-iはIKK- $\alpha$ 、IKK- $\beta$ と同様にIKB- $\alpha$ のN-末端に存在するセリン残基をリン酸化することがインビトロキナーゼアッセイで明らかになったので、レポータージーンアッセイで観察されたNF- $\kappa$ B活性能は、IKK-iがIKB- $\alpha$ のN-末端をリン酸化することに依存するものであると考えられた。IKK-iは免疫担当細胞において炎

症性の刺激により発現が誘導され、NF- $\kappa$ Bを活性化する新規なIKKキナーゼであることがわかった。

本発明のIKK-iは、LPS刺激2時間後から発現量が増加すること、発現量依存性にNF- $\kappa$ Bを活性化することから、LPS刺激によるNF- $\kappa$ Bの活性化の維持に貢献している可能性がある。IKK-iはIKK- $\alpha$ 、IKK- $\beta$ と比べその発現が免疫担当細胞に偏っているため、そのインヒビターの開発は免疫系特異的にNF- $\kappa$ Bの活性化を抑制できる可能性があり、IKK-iのコントロールは炎症性疾患の治療に貢献できることになる。

さらに、本発明のIKK-iと相互作用する分子を単離するため、酵母ツーハイブリッド法を行った。ヒトIKK-iのアミノ酸541～716番目をGAL4 DNA結合領域(Binding Domain)とのキメラタンパク質が発現できるようpAS2-1プラスミドに組み込みベイトプラスミドを作製した。これを酵母Y190株に形質転換を行い選択培地上で生育を行った。さらに得られた転換体に、GAL4活性化領域(Activation Domain)とのキメラタンパク質を発現することが可能なヒトB細胞由来のcDNAライブラリーを含むpACT2プラスミドで形質転換を行った。選択培地上で生育を行い、得られた陽性クローンよりプラスミドを回収し、最終的にDNAシーケンスにより塩基配列の決定を行った。ホモロジー検索の結果、10クローンが既に配列が報告されているI-TRAF/TANKと同一であった。

そこで、実際に細胞内においてIKK-iとI-TRAFが結合するかどうかを検討した。まず哺乳細胞内で発現可能な発現ベクターを構築した。ヒトIKK-iのN-末端側にFlagをエピトープとして付加し、発現ベクターpEF-BOSに組み込んだ。またヒトI-TRAFのN-末端側にMycをエピトープとして付加し、発現ベクターpEF-BOSに組み込んだ。これらをサル腎臓細胞株であるCOS-7細胞にリポフェクション法によりトランスフェクションを行った。24時間後、細胞を1.0%のNonidet P-40を含むバッファーで可溶化した。可溶化物を抗Flag抗体あるいは抗Myc抗体で免疫沈降し、その後可溶化物を抗Myc抗体あるいは抗Flag抗体でウェスタンブロット解析を行った。

その結果を第11図に示す。第11図のレーン1はFlag-IKK-iを、レーン2はMyc-I-TRAFを、レーン3はFlag-IKK-iとMyc-I-TRAFを示す。抗Myc抗体で免疫沈降されるFlag-IKK-i（第11図上、レーン3）と抗Flag抗体で共免疫沈降されるMyc-I-TRAF（第11図中下、レーン3）とのバンドが特異的に検出された。従って、両分子が哺乳細胞内においても複合体を形成していることが明かとなった。また各レーンにおける発現量は抗Myc抗体、あるいは抗Flag抗体での免疫沈降物を抗Myc抗体、あるいは抗Flag抗体でウェスタンブロット解析を行うことにより確認することができる（第11図、中上、下）。

次にI-TRAFのどの領域を介してIKK-iと結合しているかを上記と同様の手法を用いて検討した。まず3種類のI-TRAF欠失変異体を作製した。N-末端にMycを付加したヒトI-TRAFのアミノ酸配列の1~170、1~247あるいは193~C末端(stop)までの断片をpEF-BOSに組み込んだ。これらをCOS-7細胞にFlag-IKK-iと共にトランスフェクションを行った。24時間後に細胞を可溶化し、可溶化物を抗Myc抗体で免疫沈降後、抗Flag抗体でウェスタンブロット解析を行った。

その結果を第12図に示す。第12図のレーン1は1~170断片を、レーン2は1~247断片を、レーン3は193~stop断片を、レーン4は全長(FL(Full length))をそれぞれ示す。これらを発現させた細胞において、抗Myc抗体で免疫沈降されるFlag-IKK-iのバンドが検出された（第12図上）。従ってI-TRAFはN-末端側の170アミノ酸を介してIKK-iと結合していることが明らかとなった。また各レーンにおけるタンパク質の発現量は、可溶化物を抗Flag抗体（第12図中）、あるいは抗Myc抗体（第12図下）でウェスタンブロット解析を行うことにより確認した。

次に、I-TRAFがIKK-iによりリン酸化を受ける基質かどうかを検討した。COS-7細胞にFlag-IKK-iとMyc-I-TRAFをトランスフェクションし、24時間後可溶化した。可溶化物を抗Flag抗体あるいは抗Myc抗体で免疫沈降を行った後、沈降物にキナーゼバッファーと $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を加え反応し、インビトロキナーゼアッセイを行った。

結果を第13図に示す。レーン1、3及び5はF l a g - I K K - iのみをトランスフェクションしたものを、レーン2、4及び6は両者をトランスフェクションしたものを示す。この結果から、抗F l a g (レーン2) および抗M y c抗体 (レーン4) のいずれの免疫沈降物中において、M y c - I - T R A Fのリン酸化のバンドが検出された。従ってM y c - I - T R A FはI K K - iによりリン酸化される基質であることが明らかとなった。また各レーンにおけるタンパク質の発現量は、可溶化物を抗F l a g抗体 (第13図のレーン5、6上)、あるいは抗M y c抗体 (第13図のレーン5、6下) でウェスタンブロット解析を行うことにより確認した。

次に、I - T R A Fのどの領域がリン酸化を受けるか検討した。M y c - I - T R A Fの欠失変異体 (1~170断片、1~247断片、193~s t o p断片、全長 (F L)) をI K K - iと共にC O S - 7細胞にトランスフェクションし、可溶化物を得た。その後、抗F l a g抗体あるいは抗M y c抗体で免疫沈降し、インビトロキナーゼアッセイを行った。

結果を第14図に示す。第14図のレーン1及び5は1~170断片を、レーン2及び6は1~247断片を、レーン3及び7は193~s t o p断片を、レーン4及び8は全長 (F L (F u l l l e n g t h)) をそれぞれ示す。この結果からF L (レーン4、8) に加えM y c - I - T R A F (1~247) (レーン2、6) のリン酸化が認められた。従って少なくともI - T R A Fの171~247内にI K K - iによりリン酸化を受ける部位が存在していると考えられる。

さらに、I - T R A Fの精製タンパク質を用いて、これがI K K - iによりリン酸化を受けるかどうか検討した。まずI - T R A Fタンパク質の精製を行った。ヒトI - T R A F c D N Aを大腸菌内でグルタチオンSトランスフェラーゼ (G S T) とのキメラタンパク質として発現可能な発現プラスミドp G E X - 5 X - 1に組み込んだ。得られたベクターを大腸菌D H 5  $\alpha$ に形質転換を行った。大腸菌をL B液体培地にて終夜培養後、I P T Gを添加し3時間後に回収した。大腸菌をP B Sで溶かし超音波処理により破碎した。これにT r i t o n X - 1 0 0を1%になるように加え可溶化後、グルタチオンセファロースを加え1時間反

応させた。グルタチオンセファロースに結合したGST-I-TRAFタンパク質をグルタチオン溶液で溶出し、精製タンパク質として実験に用いた。次にCOS-7細胞にFlag-IKK-iをトランスフェクションした。同時に変異体IKK-i (K38A)を作製しトランスフェクションを行った。K38A変異体はATP結合部位と考えられるキナーゼドメイン内に存在する38番目のリジンをアラニンへ置換したものであり、多くのキナーゼはこの部位の変異によりキナーゼ活性を失うことが知られている。トランスフェクション24時間後に細胞を可溶化し、抗Flag抗体で免疫沈降を行った。免疫沈降物中に精製したGST-I-TRAFを1.0  $\mu$ g加えてインビトロでリン酸化反応を行い、キナーゼアッセイを行った。

その結果を第15図に示す。第15図のレーン1はFlag-IKK-iをトランスフェクションしたものを示し、レーン2は変異体IKK-i (K38A)をトランスフェクションしたものを示す。このようにFlag-IKK-iを発現させた細胞でGST-I-TRAFのリン酸化が認められた(第15図のレーン1の上)。一方、K38A変異体ではリン酸化は認められなかった(第15図のレーン2の上)。従ってI-TRAFはIKK-iによりリン酸化される基質であることが明らかとなった。また、K38Aが細胞内において発現していることは、可溶化物を抗Flag抗体でウェスタンブロット解析を行うことで確認した(第15図の下)。

これらの結果、IKK-iがI-TRAFとも結合することが明らかとなった。さらにインビトロキナーゼアッセイによりI-TRAFがIKK-iによりリン酸化を受ける特異的基質であることが明らかとなった。I-TRAFは当初TRAF2およびTRAF3に結合する分子として同定された分子である。TRAF分子は現在6種類同定されており、様々なレセプターに結合するアダプター分子として機能していることが知られている。特にTRAF分子はアポトーシスに関連するTNFレセプターやCD40と結合するものであり、これらのレセプター類のシグナル伝達系物質として知られている。

TRAF分子はリカンドの刺激によりレセプターと複合体を形成し活性化されるが、活性化されていない状態では細胞質内においてI-TRAFと結合するこ

とにより活性化が負に制御されていると考えられている。従って I K K - i は I - T R A F をリン酸化することで T R A F 分子の活性化に間接的に関与していると考えられる。

以上のように、本発明の I K K - i はアポトーシスなどに関連する T R A F 分子の活性化に関与していることから、T R A F 分子に関連するアポトーシス関連疾患の予防、治療、制御などに有用となる。

このように I K K - i は臨床的な観点からも非常に興味深い分子であると考えられる。本発明の医薬組成物は、I K K - i と製薬上許容される担体とからなるものであり、投与可能な形態として投与することができる。投与量は患者の様態に応じて適宜選択することができる。

本発明の医薬組成物は、免疫応答機能の改善や炎症性疾患の治療に有効である。

また、本発明においては、I K K - i 遺伝子に対するアンチセンスを本発明の医薬組成物の成分として使用することも包含するものである。

#### 実施例

次に実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 実施例 1 (m I K K - i の c D N A クローニング)

サブプレッションサブトラクティブハイブリダイゼーション法 (suppression subtractive hybridization technique) を用いて、マクロファージ系腫瘍株である R A W 2 6 4 . 7 の L P S 1 0 0 n g / m l での刺激 (+) 群と (-) 群との間でサブトラクションを施行し、L P S 刺激により誘導されてくる遺伝子のスクリーニングを行った。

その結果、M I P - 1  $\alpha / \beta$ 、G - C S F、T N F -  $\alpha$  などの既知遺伝子に加え、7つの新規遺伝子のフラグメントを得た。7つの新規遺伝子のうちクローン # 2 F 9 は 3 7 4 b p の遺伝子断片であった。クローン # 2 F 9 の遺伝子の全長を得るため、我々はまず、R A W 2 6 4 . 7 を 4 時間 L P S 刺激して得た m R N A から  $\lambda$  Z A P ファージを用いて c D N A ファージライブラリーを作製した。2

F 9 の 3 7 4 b p の フ ラ グ メ ン ト を ラ ン ダ ム ラ ベ リ ン グ 法 に て  $\alpha$ - $^{32}$ P-d C T P で 標 識 し、標 識 さ れ た 2 F 9 を プ ロ ー ブ と し て、c D N A フ ェ ー ジ ラ イ ブ ラ リー を ス ク リ ー ニ ン グ し て 遺 伝 子 の 全 長 を 得 た。

得 ら れ た ク ロ ー ン の 全 長 は 2 9 1 0 b p で あ っ た。こ の 遺 伝 子 は 2 1 5 1 b p の オ ー プ ン リ ー デ ィ ン グ フ レ ー ム (open readin frame) に 7 1 7 個 の ア ミ ノ 酸 を コ ー ド し て い た。こ の 遺 伝 子 の 塩 基 配 列 を 配 列 番 号 3 に 示 す。ま た、そ の ア ミ ノ 酸 配 列 を 配 列 番 号 4 に 示 す。

#### 実 施 例 2 (h I K K-i の c D N A ク ロ ー ニ ン グ)

既 に D D B J に 登 録 さ れ て い た 塩 基 配 列 K I A A 0 1 5 1 を も と に し て、ヒ ト 胎 盤 の c D N A ラ イ ブ ラ リー を テ ン プ レ ー ト と し て P C R 法 に よ り、ヒ ト の I K K-i の c D N A を ク ロ ー ニ ン グ し た。こ の と き の P C R 法 に 用 い た プ ラ イ マー の 配 列 は、

5'-ctttgcctgactcagggcagctcagag-3'、及 び、

5'-atgggtgcagaagagcagtggttgaatc-3'

で あ っ た。

こ の 遺 伝 子 は、2 1 4 8 b p の オ ー プ ン リ ー デ ィ ン グ フ レ ー ム (open readin frame) に 7 1 6 個 の ア ミ ノ 酸 を コ ー ド し て い た。こ の 遺 伝 子 の 塩 基 配 列 を 配 列 番 号 1 に 示 す。ま た、そ の ア ミ ノ 酸 配 列 を 配 列 番 号 2 に 示 す。

#### 実 施 例 3 (L P S 刺 激 に よ る ク ロ ー ン # 2 F 9 の 発 現)

マ ク ロ フ ェ ー ジ 系 腫 瘍 株 R A W 2 6 4 . 7 を リ ボ ポ リ サ ッ カ ラ イ ド (L P S) で 刺 激 し て 誘 導 さ れ て く る 遺 伝 子 の ノ ザ ン プ ロ ッ ト 解 析 を 行 っ た。

R A W 2 6 4 . 7 の L P S (1 0 0 n g / m l) 刺 激 前 (-) 後 (+) の ポ リ (A)<sup>+</sup> R N A 2  $\mu$  g を 1 % フ ォ ル ム ア ミ ド - ア ガ ロ ー ス に て 電 気 泳 動 し、ナ イ ロ ン メ ン ブ レ ン に 転 写 後、サ ブ ト ラ ク シ ョ ン で 得 ら れ た I K K-i の c D N A フ ラ グ メ ン ト を プ ロ ー ブ に 用 い て ハ イ ブ リ ダ イ ズ さ せ た。

結 果 を 第 1 図 に 示 す。な お、R N A 量 が 等 量 で あ る こ と を G 3 P D H を 用 い て 第 1 図 の 下 段 に 示 し た。



#### 実施例 4 (LPS 刺激によるクローン #2F9 の発現の時間経過)

RAW264.7 を  $100 \text{ ng/ml}$  の LPS で刺激し、0.5 時間、2 時間、4 時間、8 時間、12 時間、及び、24 時間経過後にトータル RNA を抽出し、 $25 \mu\text{g}$  ずつ 1% フォルムアミド-アガロースにて電気泳動し、実施例 3 と同様にノザンプロット解析を行った。プローブは実施例 2 で得られたマウス IKK- $\alpha$  (mIKK- $\alpha$ ) のコーディング領域を用いた。

結果を第 2 図に示す。なお、RNA 量が等量であることを G3PDH を用いて第 2 図の下段に示した。

#### 実施例 5 (IKK- $\alpha$ の発現)

各臓器における IKK- $\alpha$  の発現をノザンプロットで解析した。

各臓器から得られた poly(A)<sup>+</sup>RNA  $2 \mu\text{g}$  がプロットされたマルチテイスチュノザンプロットメンブレン (Clontech) を用いてノザンプロット解析を行った。プローブは hIKK- $\alpha$  のコーディング領域を用いた。

結果を第 5 図に示す。第 5 図中の矢印は、IKK- $\alpha$  の位置を示している。

#### 実施例 6 (脾臓における IKK- $\alpha$ の発現)

C57BL/6 から採取した脾細胞から抗体 (B220) を用いて、高勾配磁気細胞分離装置 (high-gradient magnetic cell separation system) MACS (Miltenyi Biotec, Berg.-Gladbach, Germany) によって B-細胞と T-細胞を分離した。B-細胞は LPS :  $100 \mu\text{g/ml}$ 、T-細胞はイオノマイシン :  $10 \mu\text{M}$  と PMA :  $10 \text{ ng/ml}$  で 4 時間刺激し、各刺激の前後でトータル RNA を抽出し  $20 \mu\text{g}$  ずつ 1% フォルムアミド-アガロースにて電気泳動させて、実施例 4 と同様にノザンプロット解析を行った。プローブは mIKK- $\alpha$  のコーディング領域を用いた。

結果を第 6 図に示す。なお、RNA 量が等量であることを G3PDH を用いて第 6 図の下段に示した。

#### 実施例 7 (マウスの細胞における I K K - i の発現)

マウスの細胞株、腫瘍株 N I H 3 T 3 (fibroblast cell line)、E L - 4 (thymoma cells)、5 E 3 (natural killer cell clone)、M O P C 3 1 5 (myeloma cells)、B C L - 1 (B cell leukemia)、及び、M 1 (monocytic leukemia cell line) のそれぞれに、L P S (1 0 0 n g / m l) 刺激前 (-) 及び 4 時間の L P S 刺激後 (+) のトータル R N A を抽出し、実施例 4 と同様にノザンプロット解析を行った。プローブは m I K K - i のコーディング領域を用いた。

結果を第 7 図に示す。なお、R N A 量が等量であることを、エチジウムブロマイドで染色したトータル R N A の電気泳動像を用いて第 7 図の下段に示した。

#### 実施例 8 (腹腔マクロファージにおける I K K - i の発現)

C 5 7 B L / 6 から採取した腹腔マクロファージを、L P S : 1  $\mu$  g / m l、P M A : 1 0 n g / m l、T N F -  $\alpha$  : 1 0 0 n g / m l、I L - 1  $\beta$  : 1 0 0 n g / m l、I F N -  $\gamma$  : 2 5 0 U / m l、I L - 6 : 2 0 0 0 U / m l でそれぞれ刺激した後、トータル R N A を抽出し、実施例 4 と同様にノザンプロット解析を行った。プローブは m I K K - i のコーディング領域を用いた。

結果を第 8 図に示す。第 8 図中の (-) は刺激をしなかった場合を示している。

なお、R N A 量が等量であることを G 3 P D H を用いて第 8 図の下段に示した。

#### 実施例 9 (I K K - i 発現ベクターの構築)

I K K - i 遺伝子の N - 末端に F L A G エピトープを結合させた。F L A G - h I K K - i フラグメントの 5' 端と 3' 端に制限酵素 S a l I サイトをつくり、次に示すプライマー配列 1 (1) 及び (2) を用いて、P C R 法にて作成した。

(1) 5' - g g g t c g a c c a c c a t g g a c t a c a a g g a c g a c g a t g a c a a g a t g c a g a g c a c a g c c a a t - 3'

(2) 5' - g t c g a c t c a g a c c a t c a g g a g g t g c - 3'

これを T - ベクター (p G E M - T) (P r o m e g a) にサブクローン後、制限酵素 S a l I で切り出して、p E F - B O S 発現ベクターへサブクローンして、発現ベクター p E F - B O S - F L A G - W T - I K K - i を構築した。

#### 実施例 10 (IKK-i による NF- $\kappa$ B の活性化)

293T細胞  $3 \times 10^5$  個に、NF- $\kappa$ B コンセンサスレポーターコンストラクト (pNF- $\kappa$ B-Luc) (Stratagene 社製) と、実施例 9 で得た IKK-i 発現ベクター pEF-BOS-FLAG-WT-IKK-i を、それぞれ  $0 \mu\text{g}$  (添加無し)、 $0.3 \mu\text{g}$ 、 $1.0 \mu\text{g}$ 、 $3.0 \mu\text{g}$  加えて、一過性的にトランスイット LT-1 (Transit LT-1) (Pan Vera Corporation 社製) を用いたリポフェクション法によりコトランスフェクションし、プロメガ (Promega) 社製のデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイシステム (Dual Luciferase Reporter assay system) を用いて、ルシフェラーゼ活性を測定した。なお、コントロールとしてベクターのみを添加したものをを用いた。

総 DNA 量は pEF-BOS-ベクターによって  $4 \mu\text{g}$  に統一した。

結果を第 9 図に示す。なお、第 9 図の下段にタンパク量を抗 FLAG 抗体 (M2) によるイミュノブロットにより評価したものを示した。

#### 実施例 11 (IKK-i の 38 番目のリジンをアラニンにした変異体の製造)

ポイントミューテーションにより、IKK-i の 38 番目のリジンをコードしている塩基を、アラニンをコードする塩基にして、IKK-i の変異体の遺伝子を作成した。ポイントミューテーションは、トランスフォーマー・サイト・ディレクティッドミュータゲネシスキット (Clontech) を用いた。

#### 実施例 12 (IKK-i の変異体の発現ベクターの構築)

実施例 11 で得た変異体の遺伝子を用いて、実施例 9 と同様にして変異体の発現ベクター pEF-BOS-FLAG-K38A-IKK-i を構築した。

#### 実施例 13 (GST-I $\kappa$ B- $\alpha$ N タンパク (WT) の製造)

I $\kappa$ B- $\alpha$  のアンキリンリピートより C-末端部分を切断したアミノ酸配列 1~72 をコードする遺伝子を製造し、これを大腸菌で発現させ、グルタチオンセファロースで精製して GST-I $\kappa$ B- $\alpha$ N タンパク (WT) を得た。ベクター

としてはファルマシア社製の p G E X 2 T を用いた。

#### 実施例 14 (G S T - I $\kappa$ B - $\alpha$ N タンパク (A A) の製造)

G S T - I  $\kappa$  B -  $\alpha$  N の 32 番目と 36 番目のセリン残基をどちらもアラニン  
をコードする塩基に変えた遺伝子を製造して、これを大腸菌で発現させ、グルタ  
チオンセファロースで精製した G S T - I  $\kappa$  B -  $\alpha$  N タンパク (A A) を得た。

#### 実施例 15 (I K K - i による I $\kappa$ B - $\alpha$ のセリン残基をリン酸化)

293T 細胞  $2 \times 10^6$  個に、p E F - B O S - M O C K、実施例 9 で得た p E  
F - B O S - F L A G - W T - I K K - i、又は、実施例 12 で得たミュータン  
トコンストラクト (p E F - B O S - F L A G - K 38 A - I K K - i) をそれ  
ぞれ用いて、10 cm ディッシュ (d i s h) 上で一過性的にトランスフェク  
ションした。24 時間後に発現された I K K - i タンパクまたは K 38 A - I K  
K - i タンパクを抗 F L A G 抗体 (M 2) によって免疫沈降により精製し、イン  
ビトロキナーゼアッセイを行った。

インビトロキナーゼアッセイの基質として、実施例 14 で得た G S T - I  $\kappa$  B  
-  $\alpha$  N タンパク (W T)、又は、実施例 15 で得たタンパク (A A) を用いた。  
I K K - i または K 38 A - I K K - i と基質と  $[\gamma - ^{32}\text{P}]$  A T P を  $30^\circ\text{C}$ 、  
20 分間反応させた後 S D S - P A G E に展開後オートラジオグラフィにて評価  
した。

結果を第 10 図に示す。第 10 図中の約 80 k D a の位置の矢印は、自己リン  
酸化のバンドを示し、その下の矢印は G S T - I  $\kappa$  B -  $\alpha$  N のバンドを示す。分  
子量 (単位 k D a) を第 10 図の左側に示している。なお、第 10 図の下段にタ  
ンパク量を抗 F L A G 抗体 (M 2) によるイミュープロットにより評価した結果  
を示した。

この結果、I K K - i は G S T - I  $\kappa$  B -  $\alpha$  N タンパク (W T) をリン酸化し  
たが、K 38 A - I K K - i は G S T - I  $\kappa$  B -  $\alpha$  N タンパク (W T) をリン酸  
化しなかった。また、I K K - i は G S T - I  $\kappa$  B -  $\alpha$  N タンパク (A A) を全  
くリン酸化しなかった。

実施例 16 (酵母ツーハイブリッド法による IKK-i と相互作用する分子の単離)

ヒト IKK-i のアミノ酸 541 ~ 716 番目を GAL4 DNA バインディングドメイン (Binding Domain) とのキメラタンパク質が発現できるよう pAS2-1 プラスミドに組み込みベイトプラスミドを作製した。これを酵母 Y190 株に形質転換を行い選択培地上で生育を行った。さらに得られた転換体に GAL4 アクティベーションドメイン (Activation Domain) とのキメラタンパク質を発現することが可能なヒト B 細胞由来の cDNA ライブラリーを含む pACT2 プラスミドを形質転換を行った。選択培地上で生育を行い、得られた陽性クローンよりプラスミドを回収し、最終的に DNA シーケンスにより塩基配列の決定を行った。ホモロジー検索の結果、10 クローンが既に配列が報告されている I-TRAF/TANK と同一であった。

実施例 17 (細胞内における IKK-i と I-TRAF の結合)

ヒト IKK-i の N-末端側に Flag をエピトープとして付加し、発現ベクター pEF-BOS に組み込んだ。

また、ヒト I-TRAF の N-末端側に Myc をエピトープとして付加し、発現ベクター pEF-BOS に組み込んだ。

さらに、ヒト IKK-i の N-末端側に Flag をエピトープとして付加し、これにヒト I-TRAF の N-末端側に Myc をエピトープとして付加して、発現ベクター pEF-BOS に組み込んだ。

これらをサル腎臓細胞株である COS-7 細胞にリポフェクション法によりトランスフェクションを行った。24 時間後、細胞を 1.0% の Nonidet P-40 を含むバッファーで可溶化して、可溶化物を抗 Flag 抗体あるいは抗 Myc 抗体で免疫沈降し、その後可溶化物を抗 Myc 抗体あるいは抗 Flag 抗体でウェスタンブロット解析を行った。

結果を第 11 図に示す。レーン 1 は Flag-IKK-i を、レーン 2 は Myc-I-TRAF を、レーン 3 は Flag-IKK-i と Myc-I-TRAF

を示す。

#### 実施例 18 (I-TRAF の IKK-i との結合領域の決定)

まず、N-末端に Myc を付加した、ヒト I-TRAF のアミノ酸配列 1~170、1~247 あるいは 193~stop 断片からなる 3 種類の I-TRAF 欠失変異体を作製した。これをそれぞれ pEF-BOS に組み込んだ。これらを COS-7 細胞に Flag-IKK-i と共にトランスフェクションを行った。24 時間後に細胞を可溶化し、可溶化物を抗 Myc 抗体で免疫沈降後、抗 Flag 抗体でウェスタンブロット解析を行った。

その結果を第 12 図に示す。第 12 図中、レーン 1 は 1~170 断片、レーン 2 は 1~247 断片、レーン 3 は 193~stop 断片、レーン 4 は全長 (Full length) を示す。

#### 実施例 19 (I-TRAF の IKK-i によるリン酸化の確認)

COS-7 細胞に Flag-IKK-i と Myc-I-TRAF をトランスフェクションし、24 時間後可溶化した。可溶化物を抗 Flag 抗体あるいは抗 Myc 抗体で免疫沈降を行った後、沈降物にキナーゼバッファと [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP を加え反応し、インビトロキナーゼアッセイを行った。

結果を第 13 図に示す。レーン 1、3 及び 5 は Flag-IKK-i のみをトランスフェクションしたものを、レーン 2、4 及び 6 は両者をトランスフェクションしたものを示す。

ように抗 Flag (レーン 2) および抗 Myc 抗体 (レーン 4) のいずれの免疫沈降物中において、Myc-I-TRAF のリン酸化のバンドが検出された。従って Myc-I-TRAF は IKK-i によりリン酸化される基質であることが明らかとなった。また各レーンにおけるタンパク質の発現量は可溶化物を抗 Flag 抗体 (レーン 5、6 上)、あるいは抗 Myc 抗体 (レーン 5、6 下) でウェスタンブロット解析を行うことにより確認した。

#### 実施例 20 (I-TRAF のリン酸化領域の決定)

Myc-I-TRAFの欠失変異体(1-170、1-247、193-stop、FL)をIKK-iと共にCOS-7細胞にトランスフェクションし、可溶化物を得た。その後、抗Flag抗体あるいは抗Myc抗体で免疫沈降し、インビトロキナーゼアッセイを行った。

結果を第14図に示す。第14図のレーン1及び5は1~170断片を、レーン2及び6は1~247断片を、レーン3及び7は193~stop断片を、レーン4及び8は全長(FL(Full length))をそれぞれ示す。

#### 実施例21 (I-TRAFタンパク質のIKK-iによるリン酸化)

ヒトI-TRAF cDNAを大腸菌内でグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)とのキメラタンパク質として発現可能な発現プラスミドpGEX-5X-1に組み込んだ。得られたベクターを大腸菌DH $\alpha$ に形質転換を行った。大腸菌をLB液体培地にて終夜培養後、IPTGを添加し3時間後に回収した。大腸菌をPBSで溶かし超音波処理により破碎した。これにTriton X-100を1%になるように加え可溶化後、グルタチオンセファロースを加え1時間反応させた。グルタチオンセファロースに結合したGST-I-TRAFタンパク質をグルタチオン溶液で溶出し、精製タンパク質として実験に用いた。

次にCOS-7細胞にFlag-IKK-iをトランスフェクションした。同時に変異体IKK-i(K38A)を作製しトランスフェクションを行った。

トランスフェクション24時間後に細胞を可溶化し、抗Flag抗体で免疫沈降を行った。免疫沈降物中に精製したGST-I-TRAFを1.0 $\mu$ g加えてインビトロでリン酸化反応を行い、キナーゼアッセイを行った。

その結果を第15図に示す。Flag-IKK-iを発現させた細胞でGST-I-TRAFのリン酸化が認められた(レーン1上)。一方、K38A変異体ではリン酸化は認められなかった(レーン2上)。また、K38Aが細胞内において発現していること可溶化物を抗Flag抗体でウェスタンブロット解析を行うことで確認した(第15図下)。

#### 産業上の利用可能性

本発明は、免疫応答に関わる種々の遺伝子の発現を制御する転写因子NF- $\kappa$ Bを活性化することができる新規のセリン／スレオニンキナーゼである新規I $\kappa$ BキナーゼIKK-i、それをコードする遺伝子及びそれを含有してなる医薬組成物を提供するものである。本発明のIKK-iはI $\kappa$ B- $\alpha$ をリン酸化しNF- $\kappa$ Bを活性化することから、この遺伝子を制御することは、免疫応答機構の改善や炎症性疾患の治療に有用である。さらに、本発明のIKK-iはI-TRAFに結合し、これをリン酸化することから、アポトーシスなどに関連するTRAF分子の活性制御に有用である。



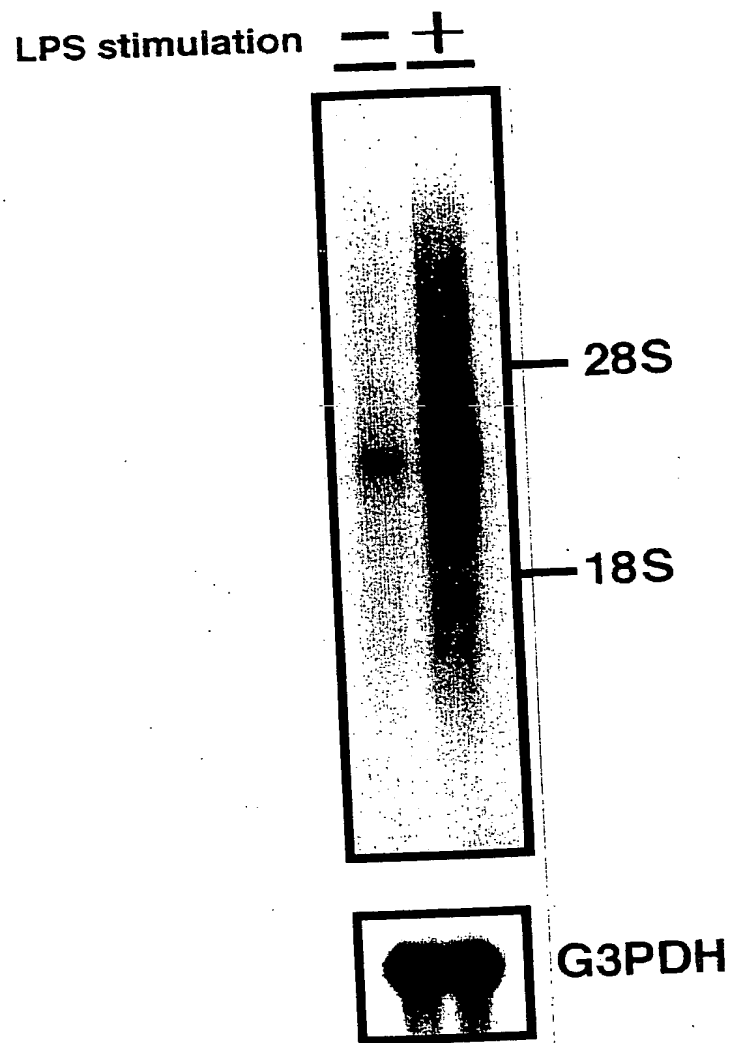
## 請 求 の 範 囲

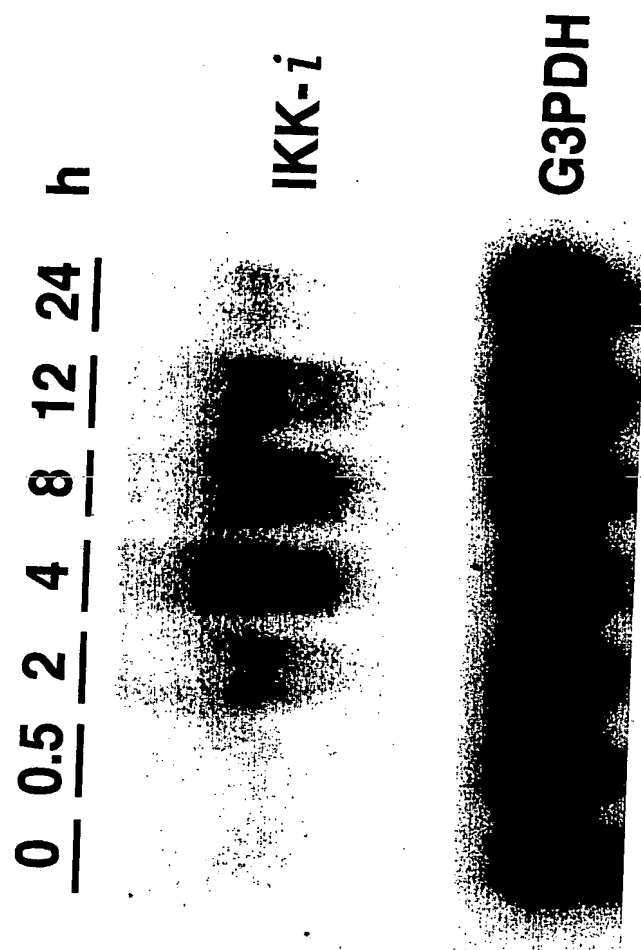
1. 配列番号 2 若しくは 4 で表されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列中の 1 個以上のアミノ酸が欠失し、他のアミノ酸で置換され、及び／又は、1 個以上の他のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有し、転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化することができる蛋白質。
2. セリン／スレオニンキナーゼである請求の範囲第 1 項に記載の蛋白質。
3. I-TRAF に結合し、I-TRAF をリン酸化する活性を有する請求の範囲第 1 項又は第 3 項に記載の蛋白質。
4. 請求の範囲第 1 項に記載の蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子。
5. 塩基配列が、配列番号 1 又は 3 で表される塩基酸配列を有する請求の範囲第 4 項に記載の遺伝子。
6. 請求の範囲第 1 項～第 3 項のいずれかに記載の蛋白質、及び、製薬上許容される担体からなる医薬組成物。
7. 免疫応答機構に作用する請求の範囲第 6 項に記載の医薬組成物。
8. I-TRAF 又は TRAF 分子が関与する疾患の予防、治療剤である請求の範囲第 6 項に記載の医薬組成物。

## 要 約 書

本発明は、免疫応答に関わる種々の遺伝子の発現を制御する転写因子NF- $\kappa$ Bを活性化することができる新規のセリン/スレオニンキナーゼである新規I $\kappa$ BキナーゼIKK-i、それをコードする遺伝子及びそれを含有してなる医薬組成物を提供する。

本発明は免疫応答に関わる種々の遺伝子の発現を制御する転写因子NF- $\kappa$ Bを活性化することができる新規のセリン/スレオニンキナーゼである新規I $\kappa$ BキナーゼIKK-i、その遺伝子及び医薬組成物に関する。





h i k k - i 1: M Q S T A N Y I W H T D D L L G Q G A T A S V Y K A R N K K S G E L V A V K V F N T T S Y L R P R E V Q V R E F E V L R K L N H Q N I V K L F A V E E 75  
 m i k k - i 1: M Q S T T N Y I W H T D D L L G Q G A T A S V Y K A R N K K S G E V V A V K V F N S A S Y R P P E V Q V R E F E V L R R L N H Q N I V K L F A V E R 75  
  
 h i k k - i 76: T G S R Q K V L V M E Y C S S G S L L S V L E S P E N A F G L P E D E F L V V L R C V V A G M N H L R E N G I V H R D I K P G N I M R L V G E E G Q 150  
 m i k k - i 76: T G S R Q K V L I M E Y C S S G S L L S V L E D P E N T F G L S E E F L V V L R C V V A G M N H L R E N G I V H R D I K P G N I M R L V G E E G Q 150  
  
 h i k k - i 151: S I Y K L T D F G A A R E L D D D E K F V S V Y G T E E Y L H P D M Y E R A V L R K P Q Q A F G V T V D L W S I G V T L Y H A A T G S L P F I P F G 225  
 m i k k - i 151: S I Y K L S D F G A A R K L D D D E K F V S V Y G T E E Y L H P D M Y E R A V L R K P Q Q A F G V T V D L W S I G V T L Y H A A T G S L P F I P F G 225  
  
 h i k k - i 226: G P R R N K E I M Y R I T T E K P A G A I A G A Q R R E N G P L E W S Y T L P I T C Q L S L G L Q S Q L V P I L A N I L E V E Q A K C W G F D Q F F A 300  
 m i k k - i 226: G P R R N K E I M Y R I T T E K P A G A I S G T Q K Q E N G P L E W S Y S L P I T C R L S M G L Q N Q L V P I L A N I L E V E E D K C W G F D Q F F A 300  
  
 h i k k - i 301: E T S D I L Q R V V H V F S L S Q A V L H H I Y I H A H N T I A I F Q E A V H K Q T S V A P R H Q E Y L F E G H L C V L E P S V S A Q H I A H T T A 375  
 m i k k - i 301: E T S D I L Q R T V I H V F S L P Q A V L H H V Y I H A H N T I A I F L E A V Y E Q T N V T P K H Q E Y L F E G H P C V L E P S L S A Q H I A H T A A 375  
  
 h i k k - i 376: S S P L T L F S - T A - I P K G L A F R D P A L D V P K F V P K V D L Q A D Y N T A K G V L G A G Y Q A L R L A R A L L D G Q E L M F R G L H W V M E 448  
 m i k k - i 376: S S P L T L F S M S S D T P K G L A F R D P A L D V P K F V P K V D L Q A D Y S T A K G V L G A G Y Q A L W L A R V L L D G Q A L M L R G L H W V L E 450  
  
 h i k k - i 449: V L Q A T C R R T L E V A R T S L L Y L S S S L G T E R F S S V A G T P E I Q E L K A A E L R S R I R T L A E V L S R C S Q N I T E T Q E S L S S L 523  
 m i k k - i 451: V L Q D T C Q Q T L E V T R T A L L Y L G S S L G T E R F S S G M P D V Q E R K E A T E L R T R L Q T L S E I L S K S H N V T E T Q R S L S C L 525  
  
 h i k k - i 524: N R E L V K S R D Q V H E D - R S I Q Q I Q C C L D K M N F I Y K Q F K K S R M R P G L G Y N E E Q I H K L D K V N F S H L A K R L L Q V F Q E E C V 597  
 m i k k - i 526: G E E L L K N R D Q I H E D N K S I Q K I Q C C L D K M H F I Y K Q F K K S R M R P G L S Y N E E Q I H K L D K V N F S H L A K R L L Q V F Q E E C V 600  
  
 h i k k - i 598: Q K Y Q A S L V T H G K R M R V V H E T R N H L R L V G C S V A A C N T E A Q Q V Q E S L S K L L E E L S H Q L L Q D R A K G A Q A S P P I A P Y P 672  
 m i k k - i 601: Q T Y Q V S L V T H G K R M R Q V Q R A Q N H L H L I G H S V A T C N S E A R G A Q E S I N K I F D Q L - L L D R A S E Q G A E V S P Q P M A P H P 673  
  
 h i k k - i 673: S P T R K D L L H M Q E L C E G M K L L A S D L L D N N R I I E R L N R V P A P D V 716  
 m i k k - i 674: G P D P K D L V F H M Q E L C N D M K L L A F D L Q D N N R L I E R L H R V P S A P D V 717

hiKK-i 1 MQSTANYL-----MHTDDLGCOCATASVYKARKKSSGELVAVVENTTSYLRPEAVOVREFEVLKKNHONLVLFAVET-----GGSQKQVMEVCS 90  
hiKK-β 1 MSWSFTTQTCAMENKERRGTCGCGNLRWHNOHTGQVQKQROELSPARHNLHOLMRPHIPNVAARMBEGMONAPNDLPULAMEYCO 100  
hiKK-α 1 MERPPGRPGAGGPHWRERLGTGCGNCLYQHRELDLKAKKSELBSTKNRERNGHETQIMKKNHANWAKACVPEELNIDI-HDVPULEAMEYCS 99

hiKK-i 91 SSSLSVLESBENAFGPEDEFWVRCVVAQNMHRENGHVHBIKPGNMRVGEHQSHYKLTDFEARREDDDEKFSVYVGTETEVEHPDMYERAVL 190  
hiKK-β 101 GGDPRKYNQFENGCGPRGAKITLSDAASALSMHNRHHRHDEKPEHNV-LOOGEORLTHKHTDEGVAKRBDGSGHETSAGTIOYHAPELLE-----195  
hiKK-α 100 GGDPRKLNKPENGCGGKESQLESLSGSGSIRATHENKTEHREDEKPEHNV-LODVCEKIHKKHEDDGGAKDVDOGSUGTSVWETLOVAPELLE-----194

hiKK-i 191 RKPOQAFGVIVDLMSIGVTLYHAAUGSLNILE-----FGPPNKKEIMYRITTEKKPAGATA-GAORRENGPEHMSYTLRITCOSEGLQSQLPILAN 283  
hiKK-β 196 -----OOKYIVAVDMSHGLLAEGTGFPEHFNWQVQHSVROKSEVDVWSDNLGTVKSSSLBYENNENSVLAERLEKHTQIMLMWHPRQGT- 290  
hiKK-α 195 -----NRPYTAIVDMSHGLVVEGACGYRPHHLOPFTWHEKIKKDPKCEFACEHMSGEVRESHHPQENSCSLIVEFEMENWEOQLMNWDPPQQRGP 290

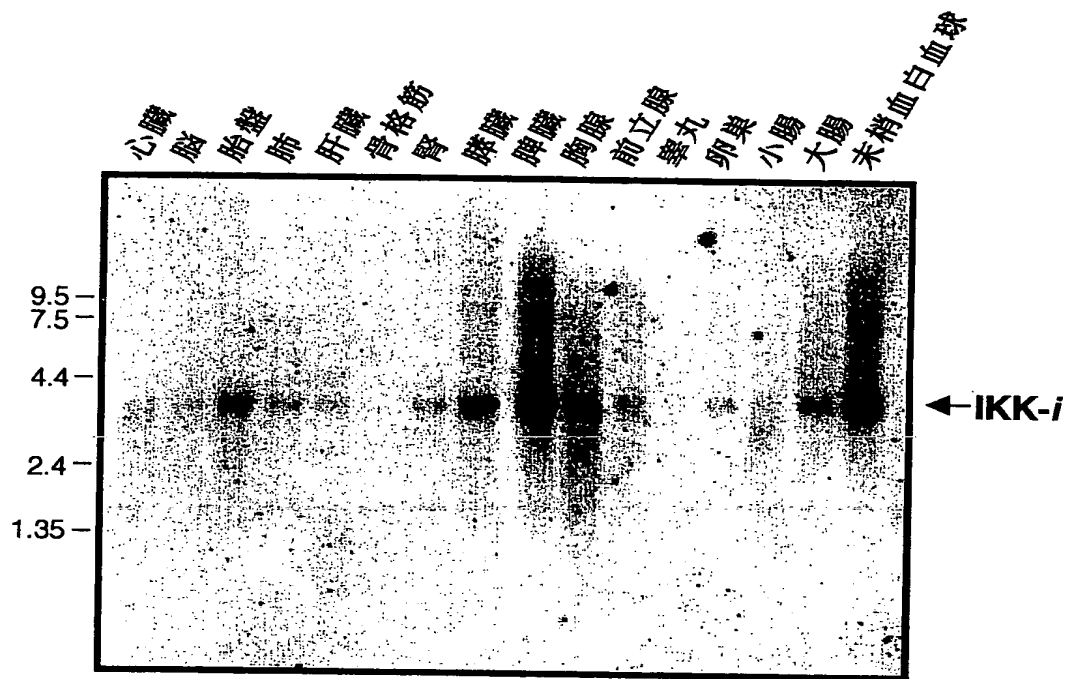
hiKK-i 284 I-LEVEQAKGWGFDQFAETSDILQVVHVPFSLSOAVLHHIYTHAHNTIAIFQEAHVHQISVAPRHQEIYFGLHCVLEPSVSAQHIAHTASSPLT-- 380  
hiKK-β 291 -DPVYCPNGC-----FKALDDPENKLVHNNVVTGTHITYPVTEHESLOSEKAROODTGPEEDQELBOAGALITIDKBAQCLSDGKLNEGHLD 383  
hiKK-α 291 VDLTLKQPRQ-----EVLMDHFNENKIVHFNNTSAKHI SFLPPPEHSHLSQSKEREICQINTGSOELLESSEGISIDPRKPASGCV-----LDGVRGCD 380

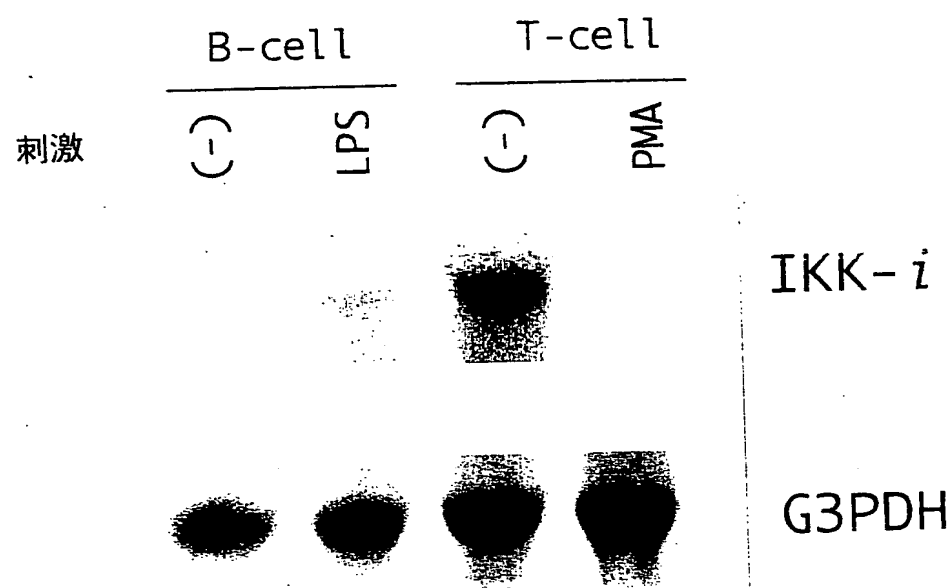
hiKK-i 381 -----IJS-----HAIPKGLAFOPALDIPKFPVKVDLQADYNTAKGVLGAGYOALRLARA-----LLDGOELMPFGLHWV-----MEVLOATCRRTLVARTSL 465  
hiKK-β 384 MDLVFTDNSKITVETQISPRQPESSVSCILQEPARNAFFQERKVGQVHSHQTHEDCNRLQCGQORAMNENRNNSCSHKKNMSMASMSQQLKAKL 483  
hiKK-α 381 SYMVYEDKSKIVMEGPFASLSDCVNYEVQDSKIQIPIICLRKVMAEAVHYVSGIKHEDYSREFOGQRAAMLSEHRYNANLTKMKNTLISASQQLKAKL 480

hiKK-i 466 LYLSSS-EGTERFSSVAGTPEIQELKAAAEERSRLKTLAEVLSRQSN--ETETOESLSSEHRELKSRDOVHEDRSIQIQCCCLDKMNFYKQFK-KS 560  
hiKK-β 484 DFFKTEIQIDHEKSEQTEF-----GUTSDKILAM-KEMEQAVELGRENKLVVERMMAOTDIDLORSBMEKOGGTLDDEEOARELYRRLREKP 578  
hiKK-α 481 EFFHKSTQDLDERYSEOMTY-----GISSEKMEKAM-KEMEKAIHYAEVGVIGYEDQIMSEHAEHMEFOKSPYGRROGDLMESUEQRAIDLEYKQLKHRP 575

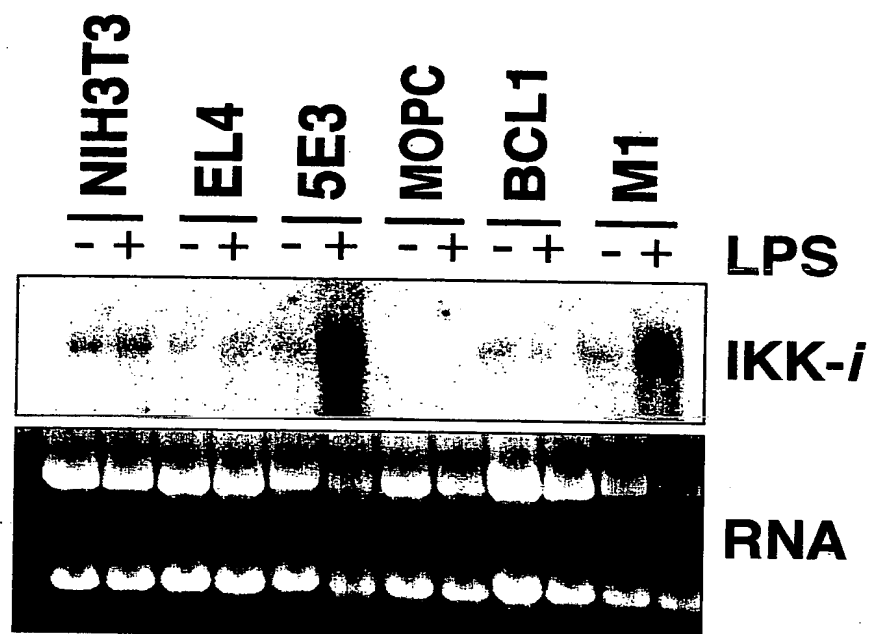
hiKK-i 592 RMRPGIYNETQIH-----KLDKYNESHAK-----RLQVFOEECVQKYOASLVTHGRMRVHVHETRN-----HRLVGGSVAAACNTEAQGVQE 640  
hiKK-β 579 RDORTEGDSQEWRLLLQAIQSPFKVRVITYOBEKTVWCQKAPAEHBPK--VEEVSVLMNDEKIVVRLQERHOKELMNLKJAGSK-----VRG 667  
hiKK-α 576 SDH-SYSBSITENWKIIVHTVQSDRVRLKELFGHESKLLGCKKMIIDEBEK--MEVALSNIKEADNIAFMFGKQKQKEIWHDEKTAGTQSSARSL-----VGS 669

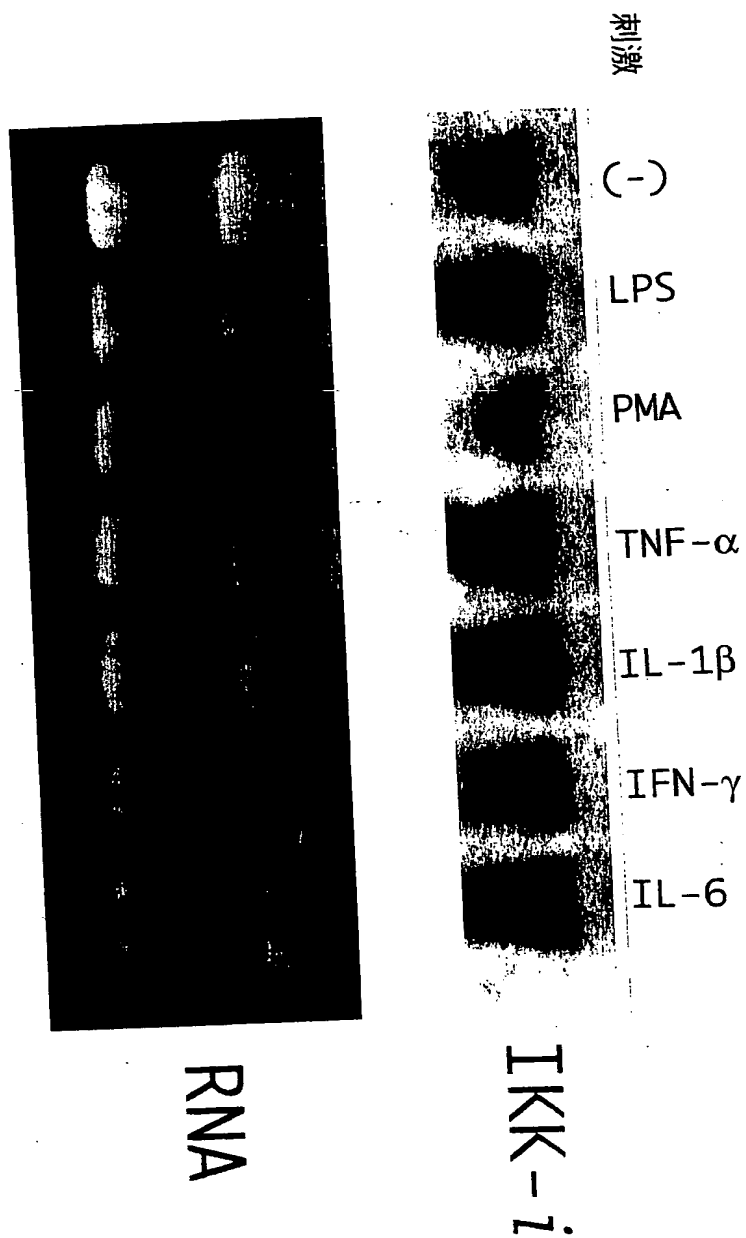
hiKK-i 641 SLSKLLEELSHQLQODRAKGAQASPPPIAPYSETRN--DULLHMQELEGOM--KLLASDLLDNRIIERENRVAPPD-----V 716  
hiKK-β 668 FVSGSPDSMNASRHSQFGQLMSQPEASNSLEPEAKSEEVVAHAHNG-TLLENATQDTVREDOQFTALDWSNLOTQEEEEHSCLEQAS 756  
hiKK-α 670 SLEGAVTPQTSAWEP-ETSAEHDHSLSCVVTQDGETSAQMIENLNGCHISTITHEANEENEGNMNLDWSME-----TE 745



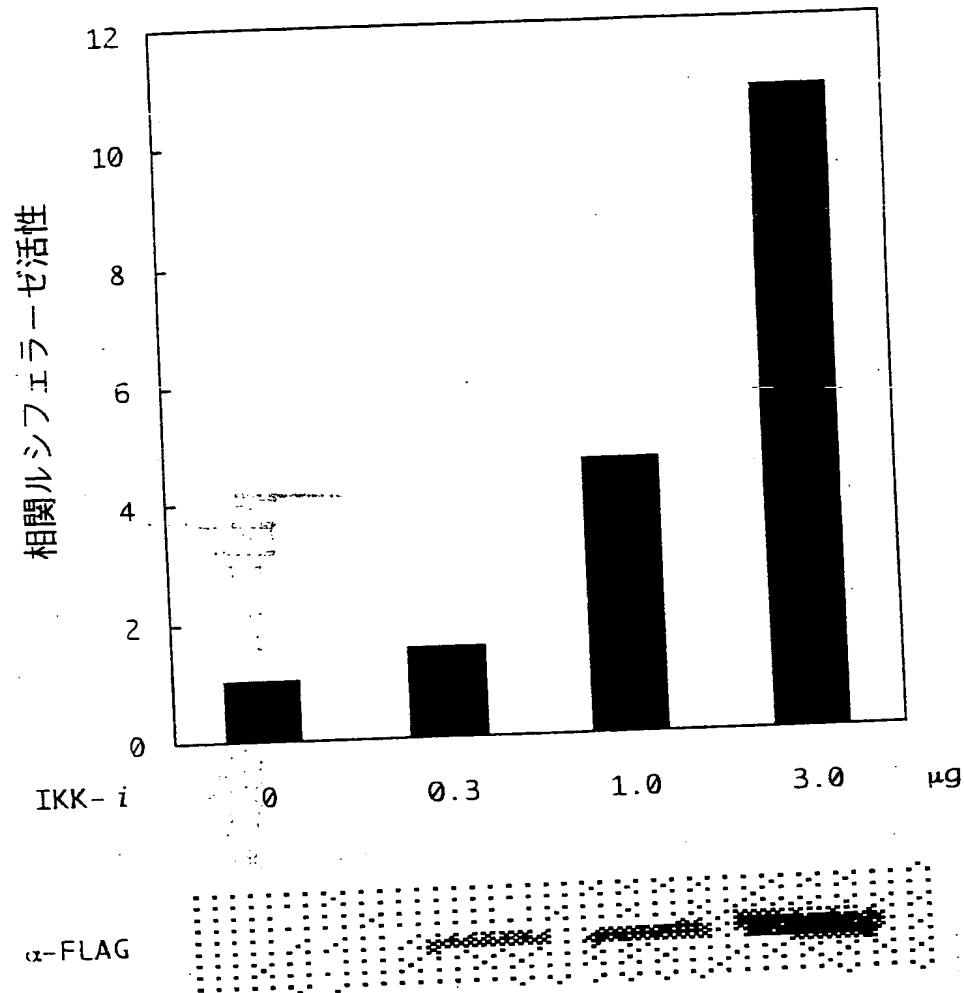


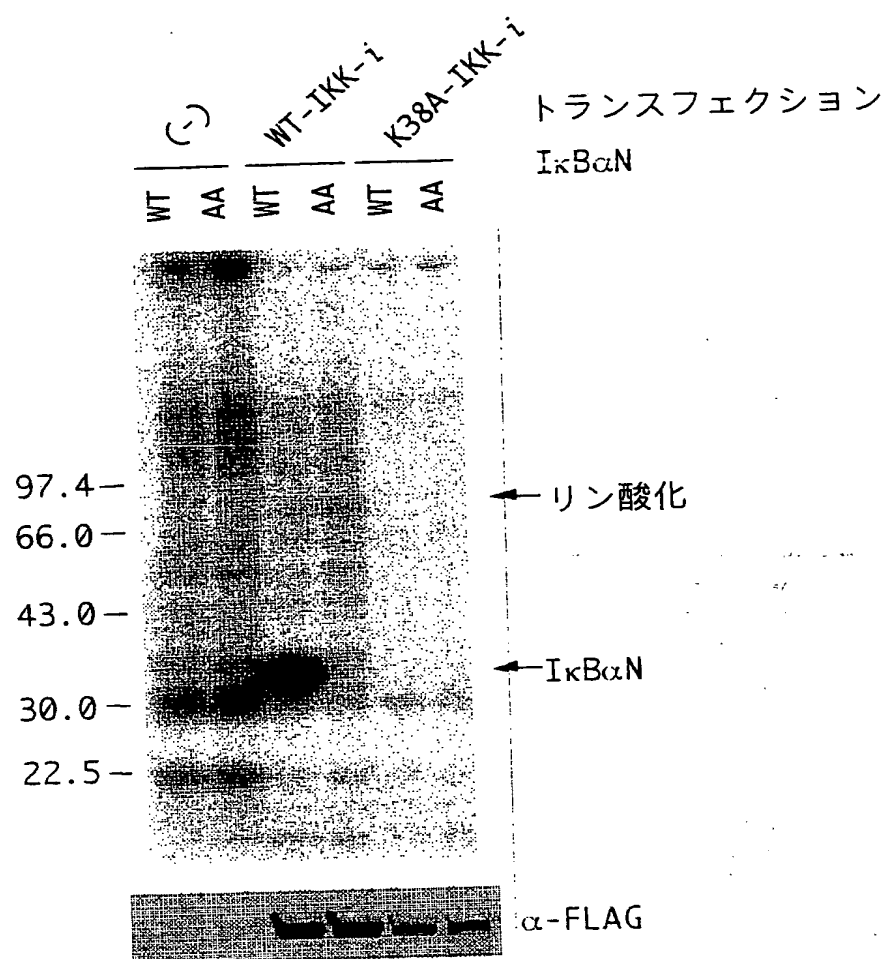




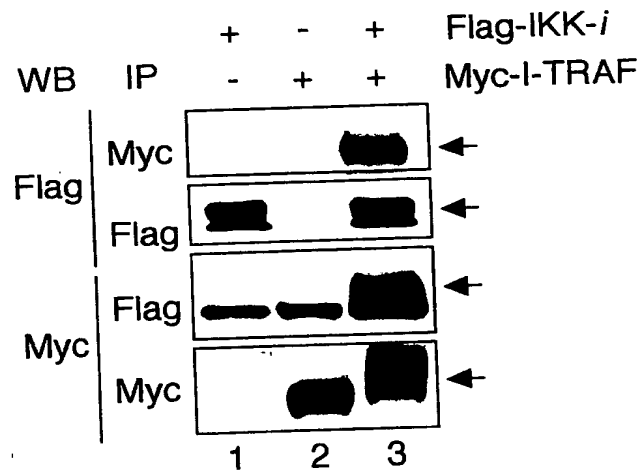


IKK- $\alpha$  の NF- $\kappa$ B 活性化能の発現

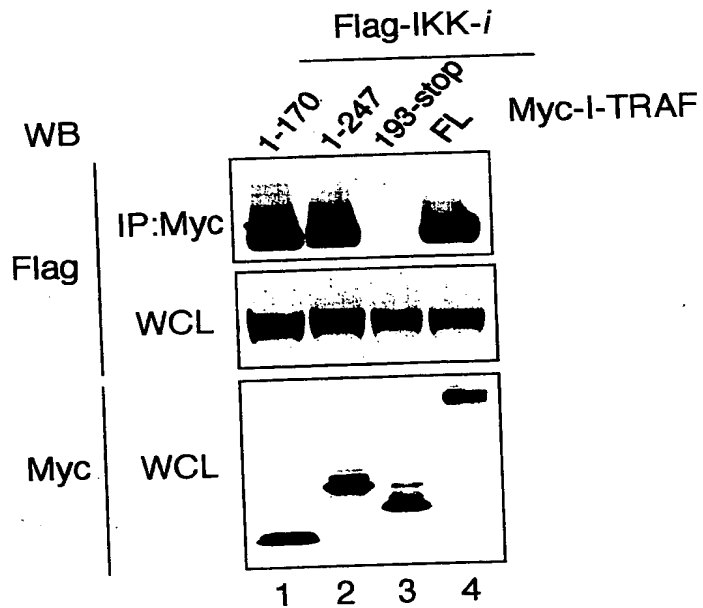




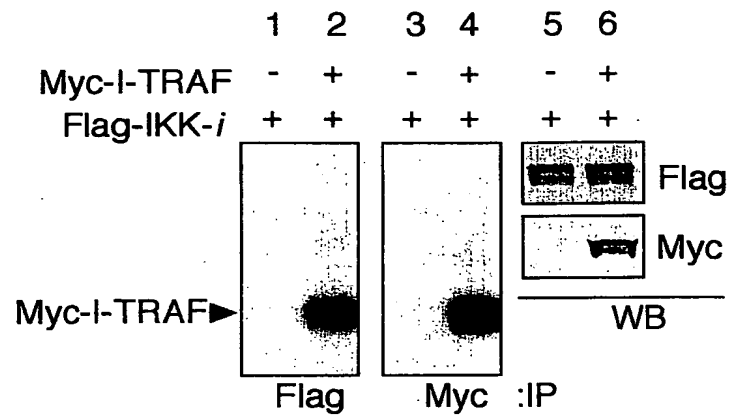
第 1 1 图



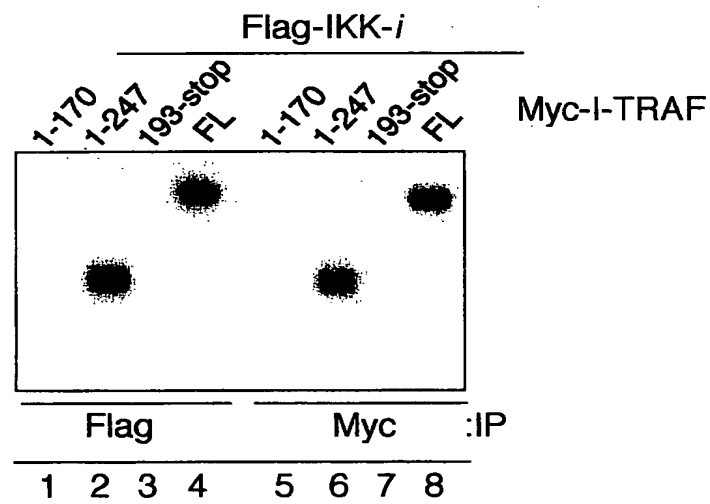
第 1 2 图

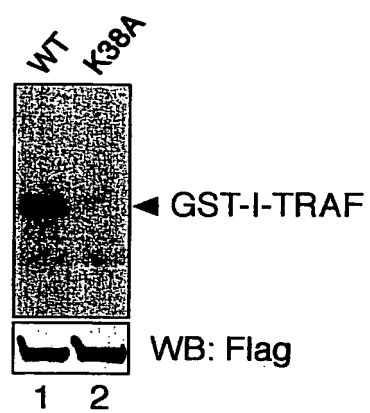


第 1 3 图



第 1 4 图





# 配列表

## SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science And Technology Corporation

<120> Identification of Novel Substrate I-TRAF of IKK-i Kinase

<130> JA901491

<160> 4

<210> 1

<211> 2154

<212> DNA

<213> Human

<400> 1

```

agatgcagag cacagccaat tacctgtggc acacagatga cctgctgggg cagggggcca      60
ctgccagtgt gtacaaggcc cgcaacaaga aatccggaga gctggttgct gtgaaggtct      120
tcaacactac cagctacctg cggccccgcg aggtgcaggt gagggagttt gaggtcctgc      180
ggaagctgaa ccaccagaac atcgtcaagc tctttgcggt ggaggagacg ggcggaagcc      240
ggcagaaggt actggtgatg gagtactgct ccagtgggag cctgctgagt gtgctggaga      300
gccctgagaa tgcctttggg ctgcctgagg atgagttcct ggtggtgctg cgctgtgtgg      360
tggccggcat gaaccacctg cgggagaacg gcattgtgca tcgcgacatc aagccgggga      420
acatcatgcg cctcgtaggg gaggaggggc agagcatcta caagctgaca gacttcggcg      480
ctgcccggga gctggatgat gatgagaagt tcgtctcggt ctatgggact gaggagtacc      540
tgcatccga catgtatgag cgggcggtgc ttcgaaagcc ccagcaaaaa gcgttcgggg      600
tgactgtgga tctctggagc attggagtga cttgtacca tgcagccact ggcagcctgc      660
ccttcatecc ctttgggtggg ccacggcgga acaaggagat catgtaccgg atcaccacag      720

```



agaagccggc	tggggccatt	gcaggtgccc	agaggcggga	gaacggggccc	ctggagtgga	780
gctacaccct	ccccatcacc	tgccagctgt	cactggggct	gcagagccag	ctggtgccc	840
tcctggccaa	catcctggag	gtggagcagg	ccaagtgtctg	gggcttcgac	cagttctttg	900
cggagaccag	tgacatcctg	cagcgagtgt	tgttccatgt	cttctccctg	tcccaggcag	960
tcctgcacca	catctatata	catgcccaca	acacgatagc	cattttccag	gaggccgtgc	1020
acaagcagac	cagtgtggcc	ccccgacacc	aggagtacct	ctttgagggt	cacctctgtg	1080
tcctcgagcc	cagcgtctca	gcacagcaca	tgcgccacac	gacggcaagc	agccccctga	1140
ccctcttcag	cacagccatc	cctaaggggc	tggccttcag	ggaccctgct	ctggacgtcc	1200
ccaagtctgt	ccccaaagt	gacctgcagg	cggattacaa	cactgccaag	ggcgtgttgg	1260
gcgccggcta	ccaggccctg	cggctggcac	gggccctgct	ggatgggcag	gagctaattgt	1320
ttcgggggct	gcaactgggtc	atggaggtgc	tccaggccac	atgcagacgg	actctggaag	1380
tggcaaggac	atccctcctc	tacctcagca	gcagcctggg	aactgagagg	ttcagcagcg	1440
tggctggaac	gcctgagatc	caggaactga	aggcggctgc	agaactgagg	tccaggctgc	1500
ggactctagc	ggaggtcctc	tccagatgct	cccaaatat	cacggagacc	caggagagcc	1560
tgagcagcct	gaaccgggag	ctggtgaaga	gccgggatca	ggtacatgag	gacagaagca	1620
tccagcagat	tcagtgtgt	ttggacaaga	tgaacttcat	ctacaaacag	ttcaagaagt	1680
ctaggatgag	gccagggtct	ggctacaacg	aggagcagat	tcacaagctg	gataagggtga	1740
atttcagtca	tttagccaaa	agactcctgc	aggtgttcca	ggaggagtgc	gtgcagaagt	1800
atcaagcgtc	cttagtcaca	cacggcaaga	ggatgagggt	ggtgcacgag	accaggaacc	1860
acctgcgcct	ggttggctgt	tctgtggctg	cctgtaacac	agaagcccag	ggggtccagg	1920
agagtctcag	caagctcctg	gaagagctat	ctcaccagct	ccttcaggac	cgagcaaagg	1980
gggctcagge	ctcgccgcct	cccatagctc	cttaccccag	ccctacacga	aaggacctgc	2040
ttctccacat	gcaagagctc	tgcgagggga	tgaagctgct	ggcatctgac	ctcctggaca	2100
acaaccgcat	catcgaacgg	ctaaatagag	tcccagcacc	tcctgatgtc	tgag	2154

<210> 2

<211> 716

<212> PRT

<213> Human

<400> 2

Met Gln Ser Thr Ala Asn Tyr Leu Trp His Thr Asp Asp Leu Leu	15
Gly Gln Gly Ala Thr Ala Ser Val Tyr Lys Ala Arg Asn Lys Lys	30
Ser Gly Glu Leu Val Ala Val Lys Val Phe Asn Thr Thr Ser Tyr	45
Leu Arg Pro Arg Glu Val Gln Val Arg Glu Phe Glu Val Leu Arg	60
Lys Leu Asn His Gln Asn Ile Val Lys Leu Phe Ala Val Glu Glu	75
Thr Gly Gly Ser Arg Gln Lys Val Leu Val Met Glu Tyr Cys Ser	90
Ser Gly Ser Leu Leu Ser Val Leu Glu Ser Pro Glu Asn Ala Phe	105
Gly Leu Pro Glu Asp Glu Phe Leu Val Val Leu Arg Cys Val Val	120
Ala Gly Met Asn His Leu Arg Glu Asn Gly Ile Val His Arg Asp	135
Ile Lys Pro Gly Asn Ile Met Arg Leu Val Gly Glu Glu Gly Gln	150
Ser Ile Tyr Lys Leu Thr Asp Phe Gly Ala Ala Arg Glu Leu Asp	165
Asp Asp Glu Lys Phe Val Ser Val Tyr Gly Thr Glu Glu Tyr Leu	180
His Pro Asp Met Tyr Glu Arg Ala Val Leu Arg Lys Pro Gln Gln	195
Lys Ala Phe Gly Val Thr Val Asp Leu Trp Ser Ile Gly Val Thr	210
Leu Tyr His Ala Ala Thr Gly Ser Leu Pro Phe Ile Pro Phe Gly	225
Gly Pro Arg Arg Asn Lys Glu Ile Met Tyr Arg Ile Thr Thr Glu	240
Lys Pro Ala Gly Ala Ile Ala Gly Ala Gln Arg Arg Glu Asn Gly	255
Pro Leu Glu Trp Ser Tyr Thr Leu Pro Ile Thr Cys Gln Leu Ser	270
Leu Gly Leu Gln Ser Gln Leu Val Pro Ile Leu Ala Asn Ile Leu	285
Glu Val Glu Gln Ala Lys Cys Trp Gly Phe Asp Gln Phe Phe Ala	300
Glu Thr Ser Asp Ile Leu Gln Arg Val Val Val His Val Phe Ser	315
Leu Ser Gln Ala Val Leu His His Ile Tyr Ile His Ala His Asn	330
Thr Ile Ala Ile Phe Gln Glu Ala Val His Lys Gln Thr Ser Val	345
Ala Pro Arg His Gln Glu Tyr Leu Phe Glu Gly His Leu Cys Val	360
Leu Glu Pro Ser Val Ser Ala Gln His Ile Ala His Thr Thr Ala	375
Ser Ser Pro Leu Thr Leu Phe Ser Thr Ala Ile Pro Lys Gly Leu	390
Ala Phe Arg Asp Pro Ala Leu Asp Val Pro Lys Phe Val Pro Lys	405
Val Asp Leu Gln Ala Asp Tyr Asn Thr Ala Lys Gly Val Leu Gly	420

Ala Gly Tyr Gln Ala Leu Arg Leu Ala Arg Ala Leu Leu Asp Gly	435
Gln Glu Leu Met Phe Arg Gly Leu His Trp Val Met Glu Val Leu	450
Gln Ala Thr Cys Arg Arg Thr Leu Glu Val Ala Arg Thr Ser Leu	465
Leu Tyr Leu Ser Ser Ser Leu Gly Thr Glu Arg Phe Ser Ser Val	480
Ala Gly Thr Pro Glu Ile Gln Glu Leu Lys Ala Ala Ala Glu Leu	495
Arg Ser Arg Leu Arg Thr Leu Ala Glu Val Leu Ser Arg Cys Ser	510
Gln Asn Ile Thr Glu Thr Gln Glu Ser Leu Ser Ser Leu Asn Arg	525
Glu Leu Val Lys Ser Arg Asp Gln Val His Glu Asp Arg Ser Ile	540
Gln Gln Ile Gln Cys Cys Leu Asp Lys Met Asn Phe Ile Tyr Lys	555
Gln Phe Lys Lys Ser Arg Met Arg Pro Gly Leu Gly Tyr Asn Glu	570
Glu Gln Ile His Lys Leu Asp Lys Val Asn Phe Ser His Leu Ala	585
Lys Arg Leu Leu Gln Val Phe Gln Glu Glu Cys Val Gln Lys Tyr	600
Gln Ala Ser Leu Val Thr His Gly Lys Arg Met Arg Val Val His	615
Glu Thr Arg Asn His Leu Arg Leu Val Gly Cys Ser Val Ala Ala	630
Cys Asn Thr Glu Ala Gln Gly Val Gln Glu Ser Leu Ser Lys Leu	645
Leu Glu Glu Leu Ser His Gln Leu Leu Gln Asp Arg Ala Lys Gly	660
Ala Gln Ala Ser Pro Pro Pro Ile Ala Pro Tyr Pro Ser Pro Thr	675
Arg Lys Asp Leu Leu Leu His Met Gln Glu Leu Cys Glu Gly Met	690
Lys Leu Leu Ala Ser Asp Leu Leu Asp Asn Asn Arg Ile Ile Glu	705
Arg Leu Asn Arg Val Pro Ala Pro Pro Asp Val ***	716

<210> 3

<211> 2910

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 3

gaattcggca cgagaagata gccaagccca ggagatgcag agtaccacta actacctgtg	60
gcatactgat gacctgctag ggcagggggc cactgccagt gtgtacaagg cccgaaacaa	120
gaaatccggg gaggtggttg ctgtaaaggt cttcaactca gccagctatc ggcgacctcc	180

tgaggttcag	gtgagggagt	ttgaggtcct	gcggaggctg	aatcaccaga	acatcgtgaa	240
gctattcgca	gtggaggaaa	cgggaggcag	cgggcagaag	gtgctaata	tggagtactg	300
ctccagtggg	agcctgctga	gcgtgctgga	agaccctgag	aacacgttcg	ggctttctga	360
agaggagttc	ctagtgggtc	tgcgctgtgt	ggtggctggc	atgaaccacc	tgcgggagaa	420
tggcattgtc	catcgggaca	tcaaacctgg	gaacatcatg	cgcctgggtg	gcgaggaggg	480
gcagagcatc	tataagctgt	ctgacttcgg	ggctgcccgc	aagctggacg	atgatgagaa	540
gtttgtttct	gtctatggta	cagaggaata	cctgcaccct	gacatgtatg	agcgtgcagt	600
gctgcgcaaa	ccccagcaaa	aggcatttgg	tgtgactgtg	gatctctgga	gtattgggggt	660
gaccctgtac	cacgcagcca	caggcagtct	gcccttcata	cccttcgggtg	ggccccggcg	720
caacaaagag	atcatgtaca	gaatcaccac	agagaagcca	gccggggcca	tttcagggac	780
tcagaagcag	gaaaatggtc	ccttggagtg	gagctacagc	ctcccatca	cctgtagact	840
gtccatgggg	ctgcagaacc	agctgggtgc	catcctggcc	aacatcctgg	aggtggaaga	900
ggataagtgc	tggggctttg	atcagttctt	cgcggagacc	agtacattc	tgcagcgaac	960
ggtcatccac	gtcttttccc	tacccaggc	cgttttgcac	catgtctaca	tccacgccc	1020
caacacgatt	gccatctttt	tggaggctgt	atatgagcag	accaacgtga	ccccaaaca	1080
ccaggagtac	ctcttcgagg	gtcacccttg	tgtccttgag	ccaagcctct	cagcccagca	1140
catgcccac	acagctgcca	gcagccctct	aactctgttc	agcatgtcca	gcgacacacc	1200
taaggggctg	gccttcaggg	accctgctct	ggatgtccca	aagttcgtcc	ctaaggttga	1260
cctacaggcc	gattacagca	cagctaaggg	ggtgctgggc	gctggctacc	aggccctgtg	1320
gctggcgcg	gtcctgctgg	atggacaggc	gttgatgctt	cgggggttac	attgggtcct	1380
ggaggtgctt	caggacacgt	gccagcagac	actggaggtc	acacggacag	ccctcctcta	1440
cctcggcagc	agcctgggca	ctgaaagggt	cagcagtgga	tcggggatgc	ctgacgtcca	1500
ggaacgaaag	gaggccacag	agctaagaac	caggctgcag	actctctcag	agatcctgtc	1560
taaatgttcc	cacaatgtca	cagaaacca	aaggagcctg	agctgtctgg	gtgaagagct	1620
tttaaagaac	cgggaccaga	ttcatgagga	taacaaaagt	atccagaaga	ttcagtgttg	1680
tttggacaag	atgcattca	tctacaaaca	gttcaagaaa	tccaggatga	ggccagggct	1740
cagctacaat	gaggagcaga	tccacaagct	ggataaggta	aatttcagtc	atctagccaa	1800
gaggctgctg	caggtgttcc	aggaggagtg	tgtgcagacg	tatcagggtg	cgtgtgtcac	1860
acacggcaag	cggatgaggc	aggtgcagag	ggcccagaac	cacctgcata	tcattggcca	1920

ctctgtggcc acctgtaact cggaagcccg gggagcccag gagagtctga acaagatctt	1980
tgatcagctc cttctggaca gagcttccga acaggagct gaggtgtcac cgcaacctat	2040
ggctcctcat cccggccctg atccgaagga cctggctctc cacatgcagg agctttgtaa	2100
tgatatgaag ctattggcct ttgatctcca ggacaacaac cgactcatcg aacggttaca	2160
tagagttcca tcggcaccag atgtctgagc tccctggggg ttcacaaggc actcagaagc	2220
aatagaaaca ttcatattgt acccctacac tgtgagacca aattcagggc aagttctggt	2280
tccatctcac tagcctacct ccctcttggc cattggccat tggccaacaa actagcatta	2340
ctttgactgt cctcttggga agcagctagg acagggactc ctggccatcc caggcagtat	2400
ctacagaaga gaccatgcgg ctaccacagc cttatcaaga caccaagact gttcttcctt	2460
accaggctc tggaggtctg gtcttggaaa gaaaaggctc agccctctca cgctttgcac	2520
ttcccaggac cagcaggcat ctccctgtggc ttctcctgcc tctccagggt gctggatcag	2580
aatgcttatt cttcgttggt tcctgtgctg tttcctgagt gtcccatcc cctggcctca	2640
ggcaaccac aaacggcccc tctgtgcttg gtctagatgc acctgcattt gagaaagtgg	2700
gtggttgagg ctaactgctg gtgctttgag gattctcctt gaccttttct ccgaggaacg	2760
cttggttcta agaaacagct ggtcagtatc aaccacagcc atgctaactg gacagatgtt	2820
ggaacccaaa gtccctaagga gagagcaggc ctgcaccttc agacatggaa taaatacatc	2880
gccttttctg tttaaaaaaaa aaaaaaaaaa	2910

<210> 4

<211> 717

<212> PRT

<213> Mouse

Met Gln Ser Thr Thr Asn Tyr Leu Trp His Thr Asp Asp Leu Leu	15
Gly Gln Gly Ala Thr Ala Ser Val Tyr Lys Ala Arg Asn Lys Lys	30
Ser Gly Glu Val Val Ala Val Lys Val Phe Asn Ser Ala Ser Tyr	45
Arg Arg Pro Pro Glu Val Gln Val Arg Glu Phe Glu Val Leu Arg	60
Arg Leu Asn His Gln Asn Ile Val Lys Leu Phe Ala Val Glu Glu	75
Thr Gly Gly Ser Arg Gln Lys Val Leu Ile Met Glu Tyr Cys Ser	90
Ser Gly Ser Leu Leu Ser Val Leu Glu Asp Pro Glu Asn Thr Phe	105

Gly Leu Ser Glu Glu Glu Phe Leu Val Val Leu Arg Cys Val Val	120
Ala Gly Met Asn His Leu Arg Glu Asn Gly Ile Val His Arg Asp	135
Ile Lys Pro Gly Asn Ile Met Arg Leu Val Gly Glu Glu Gly Gln	150
Ser Ile Tyr Lys Leu Ser Asp Phe Gly Ala Ala Arg Lys Leu Asp	165
Asp Asp Glu Lys Phe Val Ser Val Tyr Gly Thr Glu Glu Tyr Leu	180
His Pro Asp Met Tyr Glu Arg Ala Val Leu Arg Lys Pro Gln Gln	195
Lys Ala Phe Gly Val Thr Val Asp Leu Trp Ser Ile Gly Val Thr	210
Leu Tyr His Ala Ala Thr Gly Ser Leu Pro Phe Ile Pro Phe Gly	225
Gly Pro Arg Arg Asn Lys Glu Ile Met Tyr Arg Ile Thr Thr Glu	240
Lys Pro Ala Gly Ala Ile Ser Gly Thr Gln Lys Gln Glu Asn Gly	255
Pro Leu Glu Trp Ser Tyr Ser Leu Pro Ile Thr Cys Arg Leu Ser	270
Met Gly Leu Gln Asn Gln Leu Val Pro Ile Leu Ala Asn Ile Leu	285
Glu Val Glu Glu Asp Lys Cys Trp Gly Phe Asp Gln Phe Phe Ala	300
Glu Thr Ser Asp Ile Leu Gln Arg Thr Val Ile His Val Phe Ser	315
Leu Pro Gln Ala Val Leu His His Val Tyr Ile His Ala His Asn	330
Thr Ile Ala Ile Phe Leu Glu Ala Val Tyr Glu Gln Thr Asn Val	345
Thr Pro Lys His Gln Glu Tyr Leu Phe Glu Gly His Pro Cys Val	360
Leu Glu Pro Ser Leu Ser Ala Gln His Ile Ala His Thr Ala Ala	375
Ser Ser Pro Leu Thr Leu Phe Ser Met Ser Ser Asp Thr Pro Lys	390
Gly Leu Ala Phe Arg Asp Pro Ala Leu Asp Val Pro Lys Phe Val	405
Pro Lys Val Asp Leu Gln Ala Asp Tyr Ser Thr Ala Lys Gly Val	420
Leu Gly Ala Gly Tyr Gln Ala Leu Trp Leu Ala Arg Val Leu Leu	435
Asp Gly Gln Ala Leu Met Leu Arg Gly Leu His Trp Val Leu Glu	450
Val Leu Gln Asp Thr Cys Gln Gln Thr Leu Glu Val Thr Arg Thr	465
Ala Leu Leu Tyr Leu Gly Ser Ser Leu Gly Thr Glu Arg Phe Ser	480
Ser Gly Ser Gly Met Pro Asp Val Gln Glu Arg Lys Glu Ala Thr	495
Glu Leu Arg Thr Arg Leu Gln Thr Leu Ser Glu Ile Leu Ser Lys	510
Cys Ser His Asn Val Thr Glu Thr Gln Arg Ser Leu Ser Cys Leu	525
Gly Glu Glu Leu Leu Lys Asn Arg Asp Gln Ile His Glu Asp Asn	540

Lys Ser Ile Gln Lys Ile Gln Cys Cys Leu Asp Lys Met His Phe	555
Ile Tyr Lys Gln Phe Lys Lys Ser Arg Met Arg Pro Gly Leu Ser	570
Tyr Asn Glu Glu Gln Ile His Lys Leu Asp Lys Val Asn Phe Ser	585
His Leu Ala Lys Arg Leu Leu Gln Val Phe Gln Glu Glu Cys Val	600
Gln Thr Tyr Gln Val Ser Leu Val Thr His Gly Lys Arg Met Arg	615
Gln Val Gln Arg Ala Gln Asn His Leu His Leu Ile Gly His Ser	630
Val Ala Thr Cys Asn Ser Glu Ala Arg Gly Ala Gln Glu Ser Leu	645
Asn Lys Ile Phe Asp Gln Leu Leu Leu Asp Arg Ala Ser Glu Gln	660
Gly Ala Glu Val Ser Pro Gln Pro Met Ala Pro His Pro Gly Pro	675
Asp Pro Lys Asp Leu Val Phe His Met Gln Glu Leu Cys Asn Asp	690
Met Lys Leu Leu Ala Phe Asp Leu Gln Asp Asn Asn Arg Leu Ile	705
Glu Arg Leu His Arg Val Pro Ser Ala Pro Asp Val ***	717